

TRABAJO FINAL DE GRADO

Grado en Ingeniería Química

**CONSTRUCCIÓN DE UN FILM POLIMÉRICO BASADO EN  
ÁCIDO POLIGLUTÁMICO Y NANOPARTÍCULAS DE  
POLÍMEROS CONDUCTORES PARA LA OBTENCIÓN DE  
SENSORES ELECTROQUÍMICOS**



**Memoria y Anexos**

<b>Autor:</b>	Eva Domínguez Hervella
<b>Director:</b>	Dr. Elaine Armelin Diggroc
<b>Co-Director:</b>	Sra. Brenda G. Molina
<b>Convocatoria:</b>	Junio 2018



## Resum

En aquest treball s'ha preparat un elèctrode biocompatible, electroactiu i flexible a partir d'una matriu de bio-hidrogel, l'àcid  $\gamma$ -poliglutàmic ( $\gamma$ -PGA), i nanopartícules de poli (3,4-etilendioxitiòfè) (PEDOT), un polímer conductor. Les nanopartícules de PEDOT es van afegir al hidrogel  $\gamma$ -PGA durant la reacció amb l'agent entrecreuant de cadena, la cistamina. D'aquesta manera, les nanopartícules de PEDOT, disperses en la matriu del hidrogel, es van utilitzar com punts de nucleació per a la posterior electropolimerització del poli (hidroximetil (3,4-etildioxitiòfè)) (PHMeEDOT), un polímer conductor hidrofílic. Com substrat en l'etapa d'electropolimerització es van utilitzar làmines fines de polietilèntereftalat recobertes amb una capa d'òxid d'indi i estany (PET/ITO). En aquest elèctrodes recoberts amb hidrogels conductors es va incorporar la vitamina K3. La vitamina K3 és liposoluble i s'utilitza com agent mediador per la detecció electroquímica de cèl·lules eucariotes.

La composició química, la morfologia i les propietats òptiques dels elèctrodes resultants es van estudiar mitjançant FT-IR, SEM i UV-vi.s D'altra banda, els estudis electroquímics es van realitzar per voltametria cíclica (CV) i voltametria de polsos diferencial (DPV). Al finalitzar els assajos electroquímics es va trobar que la incorporació de PHMeEDOT afavoreix la electroactivitat dels elèctrodes permetent detectar la presència i la alliberació de la vitamina K3 en un medi aquós durant set dies.

## Resumen

En este trabajo se preparó un electrodo biocompatible, electroactivo y flexible a partir de una matriz de bio-hidrogel, el ácido  $\gamma$ -poliglutámico ( $\gamma$ -PGA), y nanopartículas de poli 3,4-etilendioxitiofeno (PEDOT), un polímero conductor. Las nanopartículas de PEDOT se añadieron al hidrogel  $\gamma$ -PGA durante la reacción con el agente entrecruzante de cadena, la cistamina. De esta forma, las nanopartículas de PEDOT, dispersas en la matriz del hidrogel, se utilizaron como puntos de nucleación para la posterior electropolimerización del poli (hidroximetil (3,4-etilendioxitiofeno)) (PHMeEDOT), un polímero conductor hidrofílico. Como sustrato en la etapa de electropolimerización se emplearon láminas finas de polietilenotereftalato recubiertas con una capa de óxido de indio y estaño (PET/ITO). En estos electrodos recubiertos con hidrogeles conductores se incorporó la vitamina K3. La vitamina K3 es liposoluble y es empleada como agente mediador para la detección electroquímica de células eucariotas.

La composición química, la morfología y las propiedades ópticas de los electrodos resultantes se estudiaron mediante FT-IR, SEM y UV-vis. Por otra parte, los estudios electroquímicos se realizaron por voltametría cíclica (CV) y voltametría de pulsos diferencial (DPV). Al finalizar los ensayos electroquímicos se encontró que la incorporación de PHMeEDOT favorece la electroactividad de los electrodos permitiendo detectar la presencia y la liberación de la vitamina K3 en un medio acuoso durante siete días.

## Abstract

In this project a biocompatible, electroactive and flexible electrode was prepared from a matrix of bio-hidrogel, the acid  $\gamma$ -poliglutamic ( $\gamma$ -PGA) and nanoparticles of poly (3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT), a conductive polymer. The nanoparticles PEDOT were added to the hidrogel  $\gamma$ -PGA while the reaction with the cross-linker, cystamine. Thus, the nanoparticles of PEDOT, scattered in the matrix of the hydrogel, were used as points of nucleation to the electropolymerization of the hydroxymethyl (3,4-ethylenedioxythiophene) (PHMeEDOT), an hydrophilic conducting polymer. In the electropolymerization process, thin and flexible sheets of polyethylene terephthalate were used as substrate coated with a layer of indium tin oxide (PET/ITO). In these electrodes, K3 vitamin molecules were incorporated to the conductive bio-hydrogel formed by  $\gamma$ -PGA and PEDOT. The K3 vitamin is liposoluble and is used as mediator for the electrochemical detection of eukaryotic cells.

The chemical composition, morphology and optical properties of the resultant electrodes were studied by FT-IR, SEM and UV-vis. On the other hand, the electrochemical studies were performed by cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV). When the electrochemical assays were finished, it was found that the incorporation of PHMeEDOT favours the electroactivity of the electrodes, allowing detection of the presence or release of K3 vitamin in an aqueous medium for seven days.



## Agradecimientos

Quiero agradecer a Brenda Molina por su apoyo diario y enorme ayuda recibida diariamente durante la realización del trabajo tanto en el laboratorio como en la memoria. También agradecer a mi tutora Elaine Armelin que ha seguido la realización de la memoria con sus correcciones. Además a los compañeros del Grup d'Innovació en Materials i Enginyeria Molecular (IMEM) del Departament de Ingenieria Química de la Universitat Politècnica de Catalunya.

Asimismo, agradecer este trabajo a mis padres, mi hermano y amigos, que en todo momento me han soportado, escuchado y aconsejado tanto en este trabajo como durante esta larga pero muy productiva etapa estudiantil.

Finalmente, quiero dedicar este trabajo a mi primo que nos dejó, porque ha sido una carrera que le gustaba y siempre se ha preocupado cómo me iba, y sé que le hubiese gustado escuchar sobre el resultado final. "That's how a superhero learns to fly".

Este proyecto ha sido posible gracias al financiamiento que recibió el grupo IMEM del MINECO (MAT2015-69367-R).





## Glosario

AFM	Microscopio de Fuerza Atómica (siglas en inglés, Atomic Force Microscopy)
Ag AgCl	Plata Cloruro de plata
APS	Persulfato de amonio (siglas en inglés, ammonium persulfate)
BaSO <sub>4</sub>	Sulfato de bario
CA	Cronoamperometría
CPs	Polímeros conductores (siglas en inglés, conducting polymers)
CV	Voltametría Cíclica (siglas en inglés, cyclic voltammetry)
DBSA	Ácido dodecilbenceno sulfónico (siglas en inglés, Dodecylbenzenesulfonic acid)
DLS	Dispersión dinámica de luz (siglas en inglés, Dynamic Light Scattering)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (siglas en inglés, deoxyribonucleic acid )
DPV	Voltametría de pulso diferencial (siglas en inglés, Differential Pulse Voltammetry)
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDOT	3,4- Etilendioxitiofeno
FT-IR	Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (siglas en inglés, Fourier-transform infrared spectroscopy)
HMeEDOT	Hidroximetil (3,4-etilendioxitiofeno)
ITO	Óxido de Indio y Estaño (siglas en inglés, Indium Tin Oxid)
KBr	Bromuro de potasio
KCl	Cloruro de potasio
LEA	Pérdida de electroactividad (siglas en inglés, Loss of electroactivity)
LED	Diodo emisor de luz (siglas en inglés, Light emitting diode)
LiClO <sub>4</sub>	Perclorato de litio
NaHCO <sub>3</sub>	Hidrogenocarbonato de sodio
NPs	Nanopartículas

PBS	Solución salina tamponada con fosfato (siglas en inglés, phosphate buffered saline)
PbS	Sulfuro de plomo
PCL	Policaprolactona
PCP	Poli [N-(2-cianoetil) pirrol]
PEDOT	Poli (3,4-etilendioxitiofeno)
PEG	Polietilenglicol
PET	Tereftalato de polietileno
PGA	Ácido poliglutámico
PHMeEDOT	Poli (hidroximetil-3,4-etilenedioxitiofeno)
PLA	Ácido poliláctico (siglas en inglés. Poly (lactic acid))
PMP	Poli(N-metilpirrol)
PPy	Polipirrol (siglas en inglés, polypyrrole)
PTh	Politiofeno (siglas en inglés, polythiophene)
SEM	Microscopio electrónico de barrido (siglas en inglés, Scanning Electron Microscopy)
SR	Grado de hinchamiento (siglas en inglés, Swelling Ratio)
UV-vis	Ultravioleta-visible

## Símbolos

$\Delta Q$ control	Diferencia entre la carga (C) del primero y el último ciclo de voltametría cíclica de control
$Q_i$	Carga correspondiente al primer ciclo de voltametría cíclica
$\lambda$	Longitud de onda (nm)
$w_w$	Peso del hidrogel húmedo
$w_d$	Peso del hidrogel seco

# Índice

<b>RESUM</b>	<b>I</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>II</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>III</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>V</b>
<b>GLOSARIO</b>	<b>VII</b>
Símbolos	viii
<b>1. PREFACIO</b>	<b>1</b>
1.1. Origen y motivación del trabajo	1
1.2. Antecedentes previos	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
2.1. Polímeros biocompatibles	3
2.2. Polímeros semiconductores	4
2.3. Sensor electroquímico	10
2.4. Objetivos del trabajo	12
2.5. Alcance del trabajo	12
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>13</b>
3.1. Materiales	13
3.2. Metodología	14
3.3. Caracterización espectroscópica	17
3.4. Caracterización microscópica	19
3.5. Caracterización electroquímica	20
3.6. Caracterización del sensor	21
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>23</b>
4.1. Caracterización de las nanopartículas PEDOT	23
4.2. Caracterización del hidrogel de $\gamma$ -PGA cargado con nanopartículas PEDOT generado químicamente	25
4.3. Síntesis y caracterización de un material híbrido compuesto por [ $\gamma$ -PGA-PEDOT] PHMeEDOT	33
<b>5. ANÁLISIS DEL IMPACTO AMBIENTAL</b>	<b>42</b>
5.1. Impacto medioambiental de la fase experimental	42

5.2. Impacto medioambiental de los hidrogeles.....	43
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>45</b>
<b>PRESUPUESTO Y/O ANÁLISIS ECONÓMICO .....</b>	<b>47</b>
5.3. Reactivos y productos.....	47
5.4. Equipo .....	48
5.5. Personal .....	49
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>51</b>

## **1. Prefacio**

### **1.1. Origen y motivación del trabajo**

Desde hace ya varios años, el Grupo de Innovació en Materials i Enginyeria Molecular (IMEM) del departamento de Ingenieria Química de la EEBE (UPC) lleva a cabo diversas investigaciones de la aplicación de los polímeros conductores en los ámbitos como el de la biotecnología, el desarrollo de baterías y supercapacitores, o la protección contra la corrosión. Así pues, el Grupo IMEM ha trabajado en estudios avanzados de síntesis, caracterización y aplicación de polímeros conductores gracias a los proyectos de investigación subvencionados por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MCINN), así como a sus colaboraciones externas con otras universidades y otros grupos de investigación. Sin embargo, hace poco tiempo que el grupo ha empezado a trabajar con materiales poliméricos del tipo hidrogeles. Los hidrogeles son sustancias ideales para aplicación en biotecnología porque son polímeros blandos, flexibles y capaces de absorber una gran cantidad de agua, sin disolverse en este medio. Por esta razón, actualmente, se está empleando mucho en sistemas de liberación de fármacos, así como en implantes o injertos para vértebras, entre otras aplicaciones.

Cabe destacar que el Grupo IMEM tiene poca experiencia en hidrogeles, pero, recientemente, se ha defendido la primera tesis doctoral en la que se fabricó un sistema híbrido, biodegradable y flexible, compuesto por ácido poli ( $\gamma$ -glutámico) y polímero conductor

### **1.2. Antecedentes previos**

Por todo lo expuesto anteriormente, este proyecto final de grado es una continuación del trabajo empezado por los doctorandos en el que se pretende explorar más a fondo las propiedades y aplicaciones de sistemas híbridos compuestos por polímeros biodegradables y polímeros conductores.

Como antecedentes previos, cabe destacar, los trabajos realizados por la Dra. M. Saborio González (Saborio, Estrany y Alemán 2018) en el que desarrolló un supercapacitor flexible de PEDOT y  $\gamma$ -PGA para la aplicación en baterías. Su trabajo se destacó por la fabricación de varios tipos de electrodos flexibles de hidrogeles y capacitores de bajo peso. Los resultados obtenidos demuestran la viabilidad del sistema diseñado y la gran estabilidad de los materiales dentro del sistema híbrido.

El ensamblaje y desarrollo de electrodos ligeros en base a la incorporación supramolecular de partículas de PEDOT en un bio-hidrogel acuoso ( $\gamma$ -PGA) es una tecnología novedosa y que falta aún muchos otros campos por explorar.

Por tanto, el presente proyecto trata de dar continuidad a los trabajos de hidrogeles con CPs, llevados a cabo en el Grupo IMEM, debido a los excelentes resultados obtenidos previamente. Por otro lado, destacar que la novedad con respecto a los trabajos anteriores es el especial énfasis en el estudio de un sistema en el que se añade un polímero conductor hidrofílico, el PHMeEDOT, capaz de detectar la incorporación y/o a liberación de vitamina, tras una electroestimulación del hidrogel híbrido. Los detalles del proyecto, así como los resultados y conclusiones obtenidas se describen a continuación.

## 2. Introducción

### 2.1. Polímeros biocompatibles

Actualmente la industria de la biomedicina busca encontrar metodologías, materiales y/o dispositivos que permitan mejorar el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Entre los materiales más estudiados están los polímeros biocompatibles con aplicaciones en dispositivos biomédicos, ingeniería de tejidos, suministro de medicamentos, biosensores y actuadores (Karagkiozaki y Logothetidis 2014). Las interacciones entre las superficies poliméricas y organismos son el foco en muchas investigaciones, debido a que la biocompatibilidad es una de las características más importantes de un polímero biomédico en el cual la superficie interactúa con un sistema biológico.

Los polímeros biocompatibles más utilizados son el ácido  $\gamma$ -poliglutámico ( $\gamma$ -PGA), ácido poliláctico (PLA) y sus copolímeros; policaprolactona (PCL) y polietilenglicol (PEG). Sus estructuras químicas se muestran en la Figura 1. (Armelin y Molina 2016)

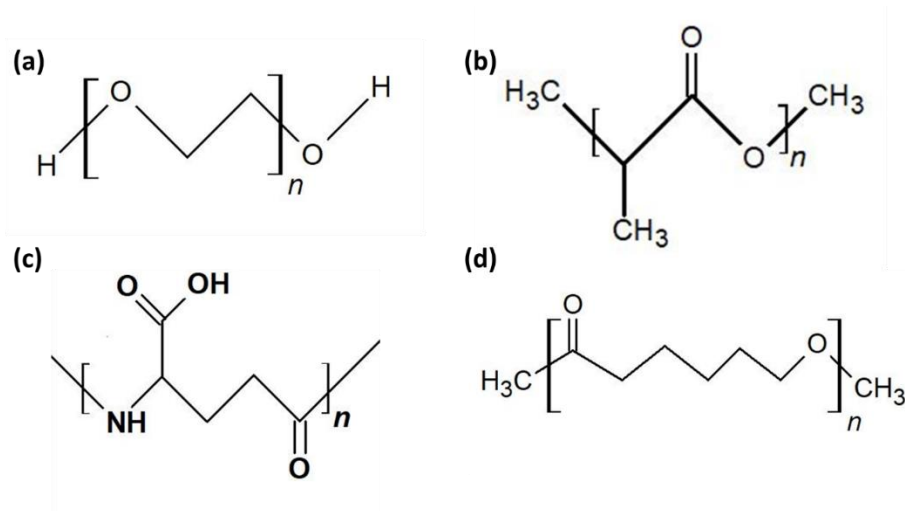


Figura 1. Estructuras químicas de polímeros biocompatibles (a) PEG, (b) PLA, (c)  $\gamma$ -PGA, (d) PCL.

## Ácido Poli ( $\gamma$ -glutámico) ( $\gamma$ -PGA)

Entre los materiales biocompatibles más usados está el ácido Poli ( $\gamma$ -glutámico) o  $\gamma$ -PGA por sus siglas en inglés. El  $\gamma$ -PGA es un polímero aniónico de origen natural, biodegradable y no tóxico para los humanos, ni para el medio ambiente. Está constituido por unidades de ácido D-glutámico y de ácido L-glutámico unidas, formando un grupo amida entre el grupo  $\alpha$ -amino y el grupo  $\gamma$ -carboxílico. Debido a la presencia de los enantiómeros D y L se podrá tener un homopolímero D, un homopolímero L o en la mayoría de los casos, un copolímero constituido por unidades D y L. La principal propiedad del  $\gamma$ -PGA es su solubilidad en agua causada por el grupo carboxílico ( $-\text{COOH}$ ). Este polímero y sus derivados se usan en diferentes campos como en la industria alimentaria, la medicina, la cosmética, agricultura y tratamiento de aguas. (Shi, Xu y Cen 2007)

En 2017, Pérez-Madrigal y colaboradores sintetizaron ocho diferentes tipos de hidrogeles de  $\gamma$ -PGA, estudiaron diferentes pesos moleculares y las relaciones molares del  $\gamma$ -PGA/EDC/cistamina. Encontraron que el hidrogel más apropiado es el que tiene una razón molar de  $\gamma$ -PGA: EDC: cistamina de 5:5:2,5 por su estabilidad mecánica y su estructura. El hidrogel  $\gamma$ -PGA más adecuado entre los obtenidos, fue seleccionado para utilizarse como medio electrolito en supercapacitores orgánicos. Los buenos resultados permiten resaltar el gran potencial de los hidrogeles  $\gamma$ -PGA como electrolitos conductores de iones sostenibles para el almacenamiento de carga. (Pérez-Madrigal et al. 2017)

## 2.2. Polímeros semiconductores

Los polímeros conductores (CPs) son materiales constituidos por unidades repetidas con una conductividad eléctrica elevada, si comparada con la de los polímeros aislantes. En este tipo de polímeros se incluyen los inorgánicos, organometálicos y polímeros orgánicos, en estos últimos las unidades monoméricas están unidas mediante enlaces covalentes. Sus excelentes propiedades ópticas y eléctricas hacen que los polímeros conductores sean ampliamente estudiados para una gran variedad de aplicaciones tecnológicas.

Un paso importante en el desarrollo de polímeros conductores se dio lugar cuando en el 1979 se demostró que se podían producir películas de polipirrol (PPy) altamente conductoras y homogéneas mediante electropolimerización oxidativa del pirrol. Desde entonces, el interés en el estudio y la obtención de nuevos CPs solo ha aumentado.

Los CPs, al igual que otros materiales poliméricos, se obtienen por reacción de polimerización como se muestra en el esquema de la Figura 2 (Fabregat y Alemán 2014), donde las unidades monoméricas se unen para formar grandes cadenas.



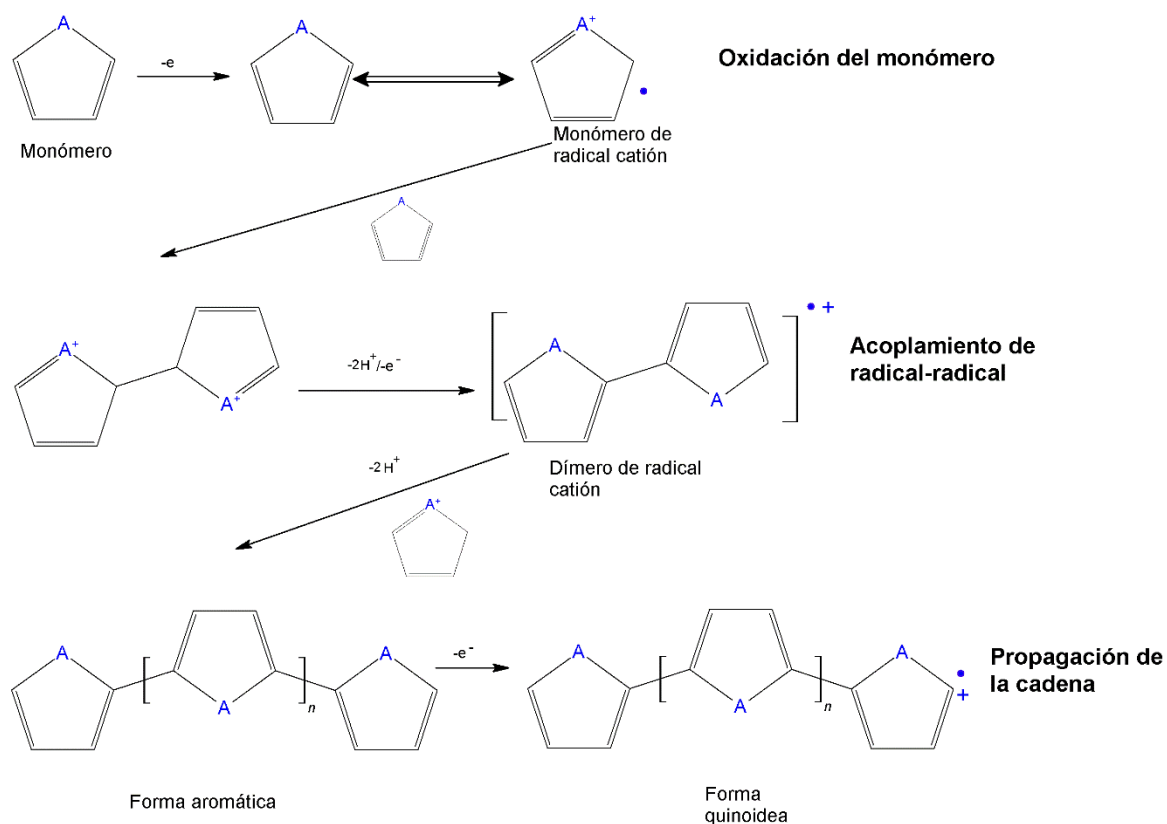


Figura 2. Proceso de polimerización

Usualmente, la polimerización ocurre por oxidación de unidades monoméricas que implican radicales catiónicos como intermediadores, por tanto, la polimerización depende de las condiciones de reacción. Además, el mecanismo, la regioregularidad, el dopaje o los rendimientos del producto son otros parámetros altamente dependientes de las condiciones de reacción. Principalmente, los polímeros conductores se obtienen de dos formas: por polimerización oxidativa y por polimerización electroquímica, Figura 3. La elección del tipo de síntesis depende de la cantidad de producto deseada como su morfología.

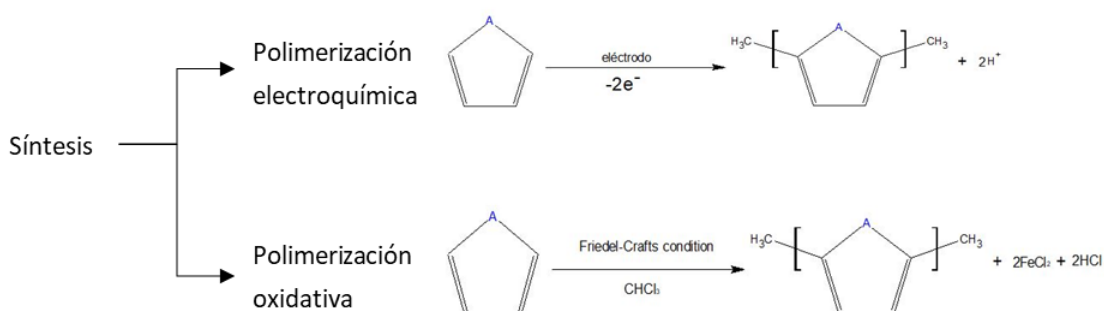


Figura 3. Esquema de los dos tipos de polimerización para obtención de polímeros orgánicos conductores.

La **polimerización oxidativa** involucra un agente oxidante que actúa como catalizador. El mecanismo de la polimerización oxidativa no está claro debido a la dificultad en estudiar un sistema con catalizador heterogéneo y fuertemente oxidante que impide la caracterización del polímero. Sin embargo, el mecanismo de catión es ampliamente aceptado para la síntesis de politiofenos.

A continuación se describen las posibles etapas de la polimerización oxidativa (Figura 4):

1. Oxidación del monómero neutral por un agente oxidante para formar el catión radical y así reducir el agente oxidante.
2. Acoplamiento del catión radical con un monómero de la misma especie con la pérdida resultante de un protón.
3. Oxidación del dímero para la reducción del agente oxidante.
4. Acoplamiento del dímero del catión con un monómero neutro con la pérdida resultante de un protón.
5. La repetición de los pasos previos para formar la cadena conjugada de polímero.

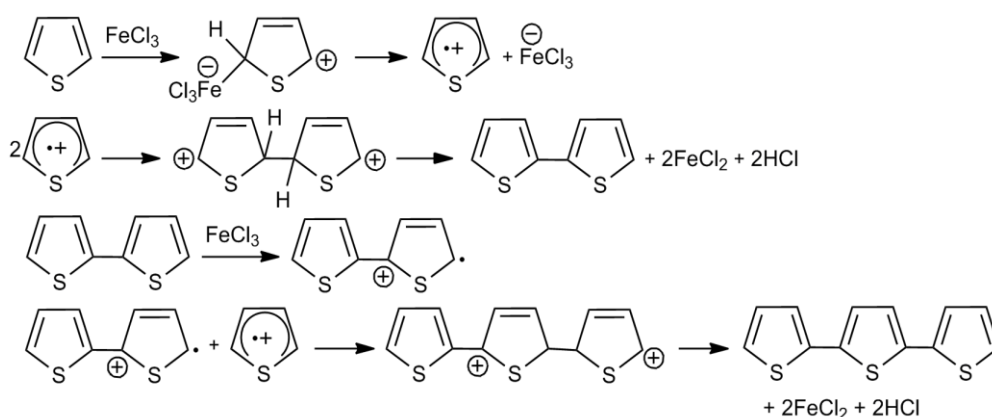


Figura 4. Mecanismo de la polimerización oxidativa del monómero tiofeno (Herrera, Curcó y Armelin 2014)

Se ha demostrado que la **electropolimerización** es más rápida que la polimerización vía síntesis química. Para realizar una polimerización electroquímica, un electrodo es sumergido en una solución que contiene el monómero, el solvente y un electrolito. Posteriormente, se aplica una corriente anódica que comienza una reacción en cadena como se muestra en el esquema de la Figura 5, formando una película de polímero sobre el área del electrodo.

La aplicación de una corriente anódica no solo hace iniciar la polimerización electroquímica, sino que también da lugar a la aparición de reacciones secundarias no deseadas como: la deposición de películas oxidantes en el área del electrodo, la oxidación del solvente y del electrolito, etc.; pero, en cambio, tiene la ventaja de la facilidad de purificación del polímero adherido al electrodo.

Los pasos generales de este tipo de síntesis son:

1. Oxidación del monómero neutro en la superficie anódica a su monómero con catión.
2. Acoplamiento de dos radicales para producir un dímero y así perder dos protones.
3. Oxidación del dímero y la consiguiente obtención de una polarón radical.
4. Acoplamiento del polarón radical de dímero con otro polarón radical monomérico, con la pérdida resultante de protones.
5. Repetición de los pasos previos para la formación del polímero neutro.

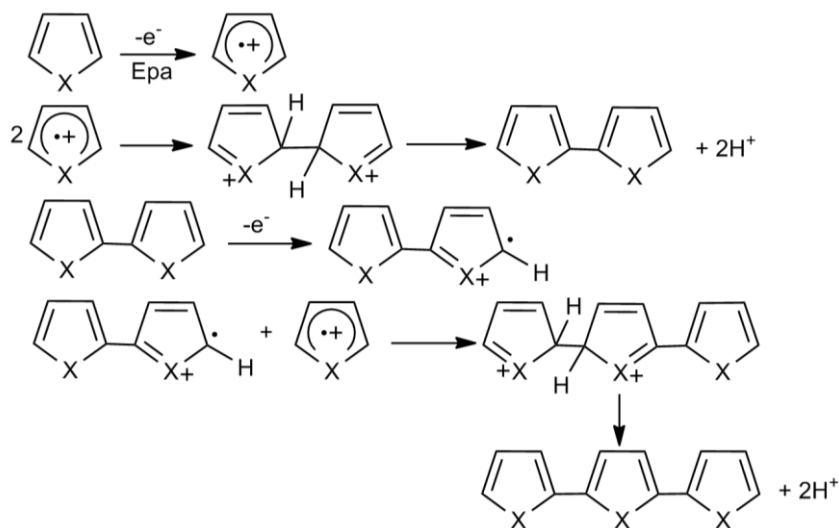


Figura 5. Mecanismo de la polimerización electroquímica de un monómero heterocíclico (Herrera, Curcó y Armelin 2014)

Ambos tipos de polimerizaciones, síntesis química oxidativa o electroquímica, presentan ventajas e inconvenientes. Las principales se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Comparación de polimerización oxidativa y electropolimerización. (Guimard, Gomez y Schmidt 2007)

Método de polimerización	Ventajas	Inconvenientes
<b>Polimerización oxidativa</b>	Producción a grande escala.  El polímero se obtiene en forma de polvo.	La purificación es necesaria.  Dificil de producir filmes finos.
<b>Electropolimerización</b>	Síntesis sencilla.  Atrapamiento de moléculas en la red polimérica.  Dopaje y síntesis son simultáneos.  Fácil de hacer filmes finos y fácil purificación.	Dificil de quitar la película de la superficie del electrodo.  El polímero obtenido adopta la forma del área de contacto de electropolimerización.

### Poli (3,4-Etilendioxitiofeno) (PEDOT)

Uno de los polímeros semiconductores de mayor interés por sus propiedades ópticas, electroquímicas y electrónicas es el poli (3,4-etilendioxitiofeno) o PEDOT. Su estructura química se muestra en la Figura 6. El PEDOT es un derivado del politiofeno (PTh), el cual suele tener una energía de gap moderada, bajo potencial de oxidación, alta conductividad, buena transparencia óptica y una excepcional estabilidad ambiental. Entre sus diversas aplicaciones en el área biomédica encontramos biosensores para la detección de secuencias de nucleótidos específicos y neurotransmisores, biocondensadores con propiedades bactericidas, sustratos bioactivos para la adhesión celular y proliferación, entre otras. (Fabregat et al. 2014)

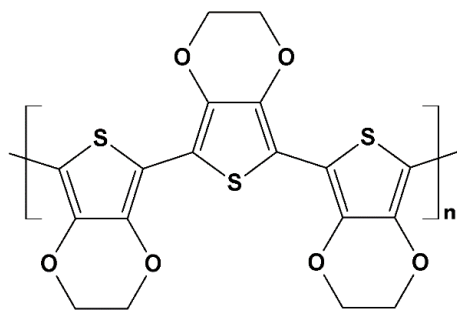


Figura 6. Estructura química del PEDOT

En el año 2017, Puiggalí-Jou y colaboradores cargaron nanopartículas de PEDOT con curcumina, un fármaco con propiedades médicas antibacteriales, antivirales, antiinflamatorias, antimicóticas y para la actividad anticancerígena ; mediante una polimerización en emulsión *in situ*, usando ácido benceno sulfónico como estabilizador y agente dopante. Los resultados indicaron que al aplicar un estímulo eléctrico a las nanopartículas conductoras es posible obtener una liberación controlada de curcumina debido a las interacciones del polímero con la droga, demostrando que otra de las aplicaciones del PEDOT es la liberación controlada de fármacos.(Puiggalí-Jou et al. 2017)

### Poli (hidroximetil-3,4-etilendioxitiofeno) (PHMeEDOT)

El poli (hidroximetil-3,4-etilendioxitiofeno) es un polímero conductor derivado del PEDOT. Su preparación se suele hacer por síntesis química oxidativa, empleando como agente oxidante el cloruro de hierro III ( $\text{FeCl}_3$ ) y el poliestireno sulfonato de sodio (PSS) como contra-ión dopante (Figura 7).

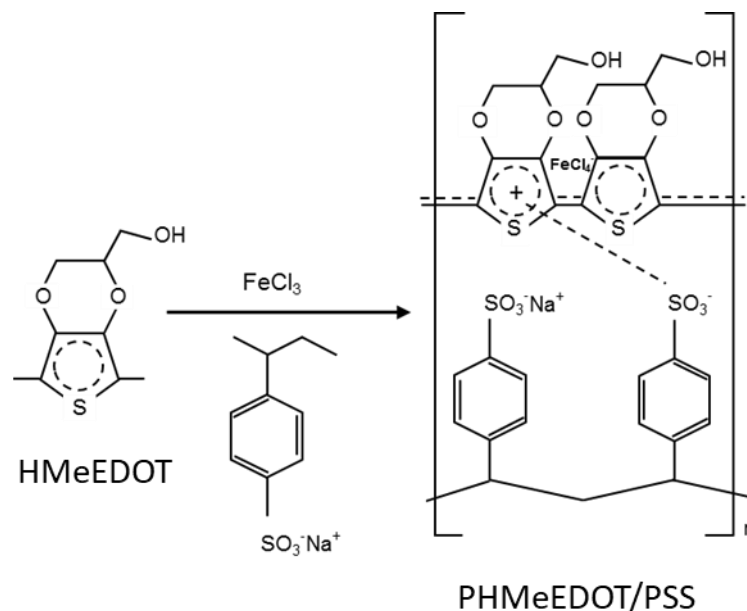


Figura 7. Síntesis química de PHMeEDOT mediante cloruro de hierro como oxidante y PSS como dopante

Debido a la presencia de los grupos OH, el PHMeEDOT es un polímero conductor polar, con una buena solubilidad en agua, lo que hace de él un material ideal para empleo en el campo biomédico. En el presente proyecto se ha realizado la síntesis del PHMeEDOT por métodos electroquímicos, tal y como se explicará más adelante en el apartado experimental.

El Grupo IMEM tiene amplia experiencia en la síntesis, la caracterización y la aplicación de este polímero en diversos ámbitos. (Rodríguez y Armelin 2015)

## 2.3. Sensor electroquímico

Debido a la combinación de propiedades eléctricas, electroquímicas, ópticas y magnéticas, los CPs se han convertido en materiales innovadores para varias aplicaciones tecnológicas, como por ejemplo, sensores de presión, temperatura, químicos y biológicos.

Entre las aplicaciones de los CPs más prometedoras son aquellas relacionadas con la interacción entre moléculas biológicas. La posibilidad de utilizar CPs, entre ellos derivados de politiofenos, para la inmovilización y detección de biomoléculas (como la dopamina) o drogas (como la morfina) ha atraído especial interés.

En 2011 Fabregat y sus colaboradores, usaron capas superfina de PCP (poli [N-(2-cianoetil) pirrol] y PMP (poli(N-metilpirrol) y sus compuestos con NPs de oro para la detección electroquímica de pequeñas concentraciones de dopamina. Los resultados mostraron que las NPs de oro mejoraron las habilidades sensitivas de los dos polímeros, aunque no son esenciales para obtener respuestas rápidas y efectivas por la presencia de dopamina. Además, la respuesta por la presencia de la dopamina es mejor del polímero conductor PCP que de la del PMP, cuando ambos tienen NPs de Au, siendo los dos polímeros altamente sensibles a la detección de una baja concentración de dopamina (Fabregat et al. 2011).

### Sensores electroquímicos con mediadores redox

Un mediador redox (reducción-oxidación) es un catalizador con la capacidad para transferir y recibir electrones, propiedad fundamental en el estudio de la actividad metabólica de las células. Estos mediadores pueden ser hidrofílicos o lipofílicos. Los primeros, son utilizados para acceder a las principales moléculas catabólicas de las células procariotas debido a que los centros redox están localizados en la membrana celular y son accesibles desde fuera de la célula. Por otro lado, en el caso de las células eucariotas la mayor parte de centros catabólicos están localizados en el citoplasma y la mitocondria. Esto hace que sea necesario el uso de mediadores lipofílicos que pueden cruzar la membrana celular e interactuar con los centros redox, reducirse y transportar el electrón fuera de la célula. (Rawson, Downard y Baronian 2014)

La **menadiona** (2-metil-1,4-naftoquinanona) o **vitamina K3** es un mediador lipofílico que recientemente ha sido utilizado en sensores de actividad celular, debido a que permite transportar electrones producidos por reacciones de reducción-oxidación intracelulares fuera de la célula. Su estructura química se muestra en la Figura 8.

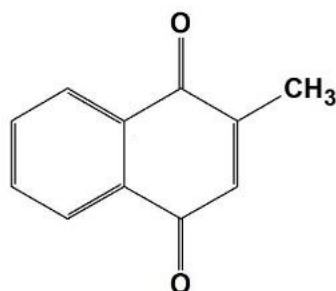


Figura 8. Estructura química de la vitamina K3.

En 2002, Baronian y colaboradores diseñaron un sensor capaz de detectar el crecimiento celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* mediante la respuesta electroquímica de un doble mediador, lipofílico e hidrofílico. En la Figura 9 se esquematiza el funcionamiento de la menadiona como mediador redox. Los resultados de voltametría cíclica indicaron que el uso de un sistema de doble mediador es tres veces mayor que uno simple. (Baronian et al. 2003)

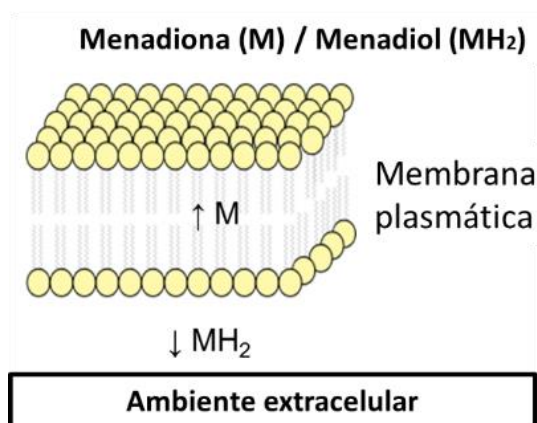


Figura 9. Menadiona como mediador redox

## 2.4. Objetivos del trabajo

El objetivo general de este proyecto es desarrollar un material híbrido, biocompatible y electroactivo, capaz de detectar mediante técnicas electroquímicas la presencia y liberación de la vitamina K3 en un medio acuoso.

Los objetivos específicos son:

- Síntesis de las nanopartículas de PEDOT.
- Síntesis del hidrogel  $\gamma$ -PGA.
- Incorporación de las nanopartículas de PEDOT a una matriz de  $\gamma$ -PGA.
- Electropolimerización oxidativa del PEDOT.
- Síntesis de los siguientes tipos de hidrogeles combinados:  $\gamma$ -PGA,  $\gamma$ -PGA/K3,  $\gamma$ -PGA-PEDOT,  $\gamma$ -PGA-PEDOT/K3, [ $\gamma$ -PGA-PEDOT] PHMeEDOT y [ $\gamma$ -PGA-PEDOT/K3] PHMeEDOT.
- Caracterización de los hidrogeles resultantes mediante FT-IR, UV-vis, SEM, voltametría cíclica y voltametría de pulso diferencial.
- Estudio de la aplicación del sistema [ $\gamma$ -PGA-PEDOT/K3]-PHMeEDOT como sensor electroquímico.

## 2.5. Alcance del trabajo

Este proyecto pretende desarrollar un material híbrido, compuesto por una matriz de  $\gamma$ -PGA y nanopartículas de PEDOT como puntos de nucleación para la posterior polimerización de PHMeEDOT. El PHMeEDOT se ha elegido como polímero conductor para la preparación del sensor debido a sus excelentes propiedades conductoras y compatibilidad con sistemas acuosos, gracias a la presencia del grupo -OH en la cadena lateral del anillo de éter. El  $\gamma$ -PGA fue sintetizado usando cistamina como agente entrecruzante y el EDC como agente condensante. La cistamina es un disulfuro orgánico, mientras que el EDC es una carbodiimida. Las nanopartículas PEDOT fueron preparadas mediante polimerización oxidativa en soluciones micelares de DBSA, el cual actúa simultáneamente como surfactante y agente dopante; la electropolimerización anódica del HMeEDOT se realizó en una solución acuosa, con  $\text{LiClO}_4$  como electrolito, empleando polietilentereftalato (PET) como sustrato, recubierto con una capa fina de ITO como electrodo sólido, conductor y flexible. También se incorporó al sistema la vitamina K3, como mediador lipofílico, para la detección de células eucariotas.



### **3. Parte experimental**

En este apartado se explica el procedimiento experimental para sintetizar las nanopartículas PEDOT y los hidrogeles de  $\gamma$ -PGA que fueron aditivados con PEDOT, vitamina K3 y/o PHMeEDOT, en diferentes configuraciones, como se verá más detalladamente en el procedimiento abajo.

Posteriormente, se explican las distintas técnicas de caracterización, que se emplearon para estudiar la morfología y composición química de los diferentes hidrogeles así como la identificación de los grupos funcionales presentes. Estas técnicas son: FTIR, UV-vis, SEM, grado de hinchamiento, espectroscopía de dispersión dinámica de luz (DLS), voltametría cíclica (CV) y voltametría de pulso diferencial (DPV).

Finalmente, se estudia la liberación de la vitamina K3 en los hidrogeles, mediante UV-vis y DPV.

#### **3.1. Materiales**

En el presente estudio se emplearon los siguientes reactivos: Ácido Poli ( $\gamma$ -glutámico) ( $\gamma$ -PGA), comprado en Wako Chemicals GmbH; ácido dodecilbenceno sulfónico (DBSA), 3,4-Etilendioxitiofeno (EDOT), amonio persulfato (APS), cistamina, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), menadiona, perclorato de litio ( $\text{LiClO}_4$ ) e hidroximetil-3,4-etilenodioxitiofeno (HMeEDOT), adquiridos en Sigma-Aldrich; hidrogenocarbonato ( $\text{NaHCO}_3$ ), suministrado por Panreac.

## 3.2. Metodología

### Síntesis de las nanopartículas de PEDOT

La síntesis de las nanopartículas de PEDOT se realizó mediante una polimerización oxidativa (Han y Foulger 2004)(Puiggalí-Jou et al. 2017). Se comenzó con la formación de micelas en 20 mL de una solución acuosa a 0,01 M de DBSA, el cual actuó como surfactante y dopante al mismo tiempo. La solución se agitó mecánicamente durante 1 hora a 750 rpm en un baño a 40°C. Posteriormente, se añadieron 88.13 µL de EDOT manteniendo las condiciones por una hora más. Por otra parte, se prepararon 5 mL de una solución a 0,08 M de APS, agente oxidante, en agua mili-Q añadiéndolos lentamente a la reacción. Esta se protegió de la luz mediante papel de aluminio y se mantuvo a 750 rpm y 40°C durante 24h.

El color de la reacción cambió de gris a azul oscuro y no se observó sedimentación, indicando así una buena estabilidad coloidal (no hubo separación de fases). Los productos secundarios fueron eliminados mediante una secuencia de 3 lavados por centrifugación a 1100 rpm durante 40 min a 4 °C. Los sobrenadantes resultantes se decantaron y el sedimento, NPs de PEDOT, se redispersó en agua mili-Q usando un baño ultrasónico a 30°C durante 15 minutos. Los sólidos del último proceso de lavado se dejaron secar a vacío durante dos días.

## Preparación de hidrogeles de $\gamma$ -PGA y sus derivados híbridos

El hidrogel de  $\gamma$ -PGA se preparó adaptando procedimientos previamente reportados (Pérez-Madrigal et al. 2017) (Matsusaki, Yoshida y Akashi 2007). Para la preparación de 1 mL de hidrogel se disolvió  $\gamma$ -PGA y EDC en una solución a 0,5 M de  $\text{NaHCO}_3$ , con agitación a 500 rpm y a una temperatura de 4°C. A continuación, se añadió a la solución anterior la cistamina, manteniendo las condiciones de agitación y temperatura durante dos minutos más. La relación molar  $\gamma$ -PGA: EDC: cistamina para la preparación fue 5: 4: 2, respectivamente. La solución final se colocó en un molde casero de vidrio de 4 x 1 x 0,1 cm<sup>3</sup> donde se dejó gelificar durante 30 minutos a temperatura ambiente. El hidrogel resultante fue lavado 3 veces en PBS 0,1 M (pH 7,4) durante 20 minutos por cada lavado. En la Figura 10 se puede observar el esquema del procedimiento descrito anteriormente.

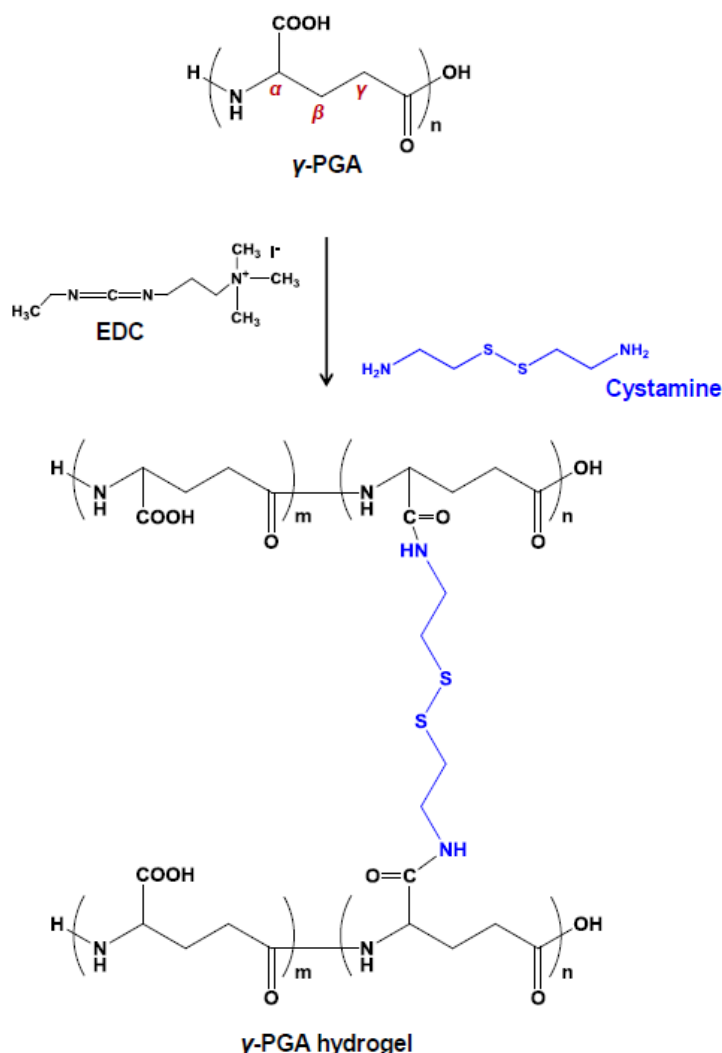


Figura 10. Ruta sintética para la preparación de los hidrogeles de  $\gamma$ -PGA, usando cistamina como agente entrecruzante (Pérez-Madrigal et al. 2017)

El compuesto  $\gamma$ -PGA-PEDOT se preparó siguiendo la metodología previamente descrita por Pérez-Madrugal et. al. Sin embargo, previo a la preparación del hidrogel, se homogenizaron nanopartículas de PEDOT (20% en peso respecto al  $\gamma$ -PGA) en la solución de  $\text{NaHCO}_3$ , para su posterior incorporación al hidrogel de PGA.

Para la incorporación de la vitamina K3 a los hidrogeles, fue necesario preparar una solución a 0,1 M de vitamina K3 en 0,5 M de  $\text{NaHCO}_3$ , la cual fue agitada mecánicamente durante 24h. Para el resto de la preparación del hidrogel se procedió de manera igual a la síntesis del  $\gamma$ -PGA-PEDOT.

Como material de referencia también se preparó el hidrogel  $\gamma$ -PGA/K3 siguiendo la metodología anteriormente descrita, pero sin la presencia de nanopartículas de PEDOT.

### Preparación de filmes de [ $\gamma$ -PGA-PEDOT] PHMeEDOT para empleo como sensor electroquímico

En una hoja de ITO/PET de  $4 \times 3 \text{ cm}^2$ , empleado como sustrato flexible y conductor, se adherieron los hidrogeles  $\gamma$ -PGA-PEDOT y  $\gamma$ -PGA-PEDOT/K3, los cuales se utilizaron como electrodos de trabajo para la polimerización electroquímica del monómero de HMeEDOT. Para la polimerización electroquímica, los hidrogeles se sumergieron durante 12 horas en una solución acuosa formada por 10 mM de HMeEDOT y 0,1 M de  $\text{LiClO}_4$ , compuesto empleado en la reacción como electrolito y carga dopante.

La electropolimerización se realizó a un potencial de oxidación de + 1,1 V hasta alcanzar  $20 \text{ mC}/0,9 \text{ cm}^3$ , en una celda con 3 electrodos (Figura 11), compuesta por el electrodo de trabajo (PET/ITO/polímero), acero AISI 316L como contra electrodo y  $\text{Ag}|\text{AgCl}$  (0.1 M KCl) como electrodo de referencia. El equipo utilizado fue un potenciostato/galvanostato AUTOLAB-302N (Figura 12), para prevenir interferencias durante la electropolimerización. Todos los electrodos fueron lavados con agua destilada al inicio de cada polimerización.

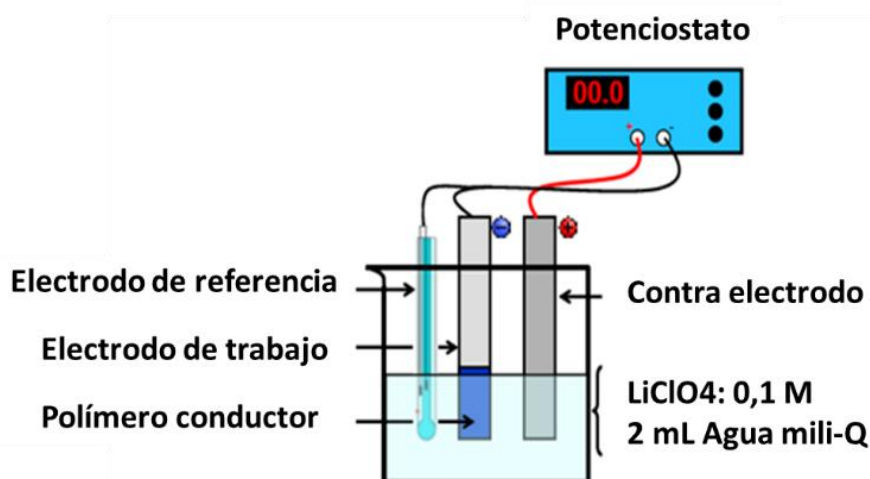


Figura 11. Esquema de una celda electroquímica de tres electrodos



Figura 12. Potenciostato Autolab PGSTAT 302N

### 3.3. Caracterización espectroscópica

#### Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

FT-IR es una técnica aplicada en química analítica para la caracterización de moléculas, es una herramienta útil para la identificación y caracterización de moléculas orgánicas. Basada en el hecho de que las moléculas absorben frecuencias específicas que son características de su estructura, estas absorciones están relacionadas con la fuerza de enlace (Chakraborty 2016). Es decir, la molécula comienza a vibrar de una manera determinada gracias a la energía que se le suministra mediante la luz infrarroja.

Hay dos categorías básicas de vibración: de tensión y flexión. Las vibraciones de tensión son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre átomos. Las vibraciones de flexión son originadas por cambios en el ángulo que forman los enlaces.

Para este trabajo, los espectros de FT-IR de los diferentes hidrogeles fueron grabados en un espectrofotómetro FTIR Jasco 4100, equipado con un accesorio ATR (Figura 13). Las muestras se evaluaron usando el software OMNIC en 32 escaneos en un rango de 4000 y 600  $\text{cm}^{-1}$  y resolución de 2  $\text{cm}^{-1}$ .



Figura 13. a) Espectrofotómetro modelo Jasco FTIR-4100 b) Accesorio ATR

## Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-vis)

La espectroscopia ultravioleta-visible (UV-vis) se usa para obtener el espectro de absorbancia o reflectancia de los materiales en la región del espectro UV-vis. Generalmente, los análisis de UV-vis se hacen en disolución, pero también se pueden estudiar sustancias sólidas y gases, si se emplean accesorios más sofisticados, como es el caso de la esfera integradora. La técnica UV-vis se basa en medir la cantidad de luz absorbida por una muestra en una longitud de onda específica. La región energética del UV-vis para el espectro electromagnético cubre 1,5-6,2 eV, que corresponde a una longitud de onda de 200-800 nm. Los electrones son transferidos de baja energía a alta energía atómica cuando el material es irradiado en esta región del espectro electromagnético. La técnica UV-vis permite la evaluación de diferentes transiciones electrónicas, que están asociadas con la longitud de onda ( $\lambda$ ). Dependiendo del rango de la longitud de onda, aparecen transiciones específicas. Por lo tanto, cuando una molécula absorbe energía un electrón es excitado de un orbital ocupado a un orbital desocupado con energía mayor.

Para este trabajo, los espectros de UV-vis de los diferentes hidrogeles fueron realizados en un espectrómetro UV-vis-NIR Shimadzu 3600 equipado con una fuente visible de halógeno, una fuente UV de arco de deuterio, un detector UV-vis de tubo fotomultiplicador, un fotodiodo InGaAs y una fotocelda con PbS enfriados con detectores NIR. Los hidrogeles liofilizados se evaluaron entre 250 nm y 750 nm de longitud de onda, usando un accesorio integrado esférico, más conocido como esfera integradora (modelo ISR-2100). En la Figura 14 se muestran el equipo de UV-vis-NIR y la esfera integradora con las muestras estándar de reflectancia de  $\text{BaSO}_4$ , mientras los otros dos soportes se emplean para el posicionamiento de la muestra de referencia y la del polímero.

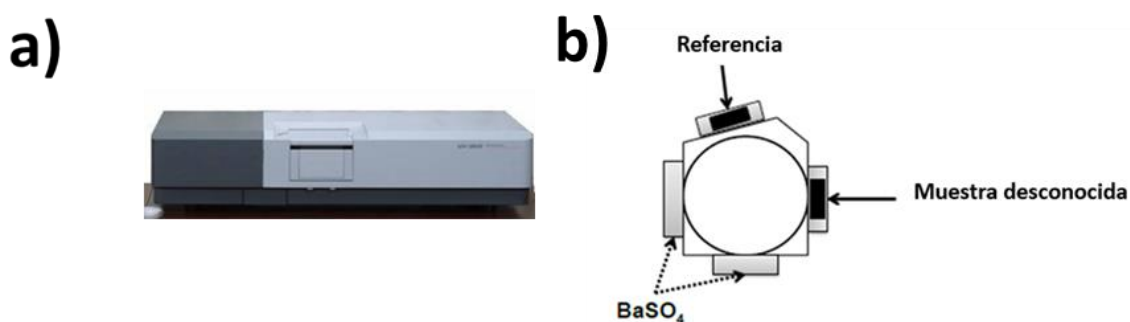


Figura 14. a) Espectrofotómetro UV-vis de doble haz (UV-3600, Shimadzu) b) Accesorio integrado esférico del UV-vis

### 3.4. Caracterización microscópica

#### Microscopia electrónica de barridos (SEM)

El microscopio electrónico de barrido es un instrumento que permite la observación y caracterización de materiales orgánicos e inorgánicos. El área a examinar se irradia con un fino enfoque de haz de electrones, produciendo así señales de electrones secundarios y retrodispersados que pueden ser usados para examinar las características de la muestra (composición, topografía de la superficie, cristalografía y otros).

La morfología de las muestras fue examinada mediante un microscopio electrónico de escaneo modelo Focussed Ion Beam Zeiss Neon 40 operando a 5 kV, equipado con un sistema EDX (Figura 15).

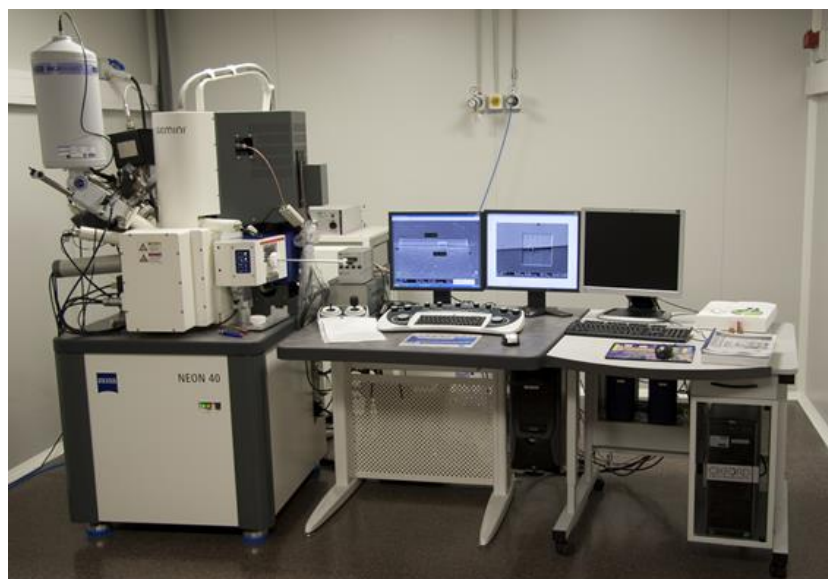


Figura 15. SEM Zeiss Neon 40

#### Dispersión dinámica de la luz (DLS)

Los estudios se realizaron con un Analizador de Potencial Zeta modelo NanoBrook Omni (Brookhaven Instruments) (Figura 16). Las mediciones se realizaron 3 veces con una duración de 120 s cada una. Las muestras fueron analizadas a 25°C usando un ángulo de escaneo de 90°.



Figura 16. Equipo de dispersión dinámica de la luz modelo NanoBrook Omni (Brookhaven Instruments)

### Microscopía digital

Las imágenes macroscópicas de los hidrogeles durante todo el estudio se obtuvieron mediante un microscopio digital modelo Dino-Lite AM7013MZT (Figura 17).



Figura 17. Microscopio digital Dino-Lite.

## 3.5. Caracterización electroquímica

### Voltametría cíclica (CV)

La voltametría cíclica (CV) es una técnica electroanalítica versátil para el estudio de especies electroactivas que permite observar rápidamente el comportamiento redox (reducción-oxidación) sobre un rango amplio de potencial. La CV es obtenida midiendo la corriente en el electrodo de trabajo durante el escaneado de potencial; esta corriente puede considerarse una señal de respuesta a la señal de excitación potencial.



La caracterización electroquímica de los hidrogeles se realizó en el ya mencionado Autolab PGSTAT302N con una celda similar a la celda estándar de electropolimerización. El medio utilizado fue PBS 0,1 M (pH 7,4) en un rango de potencial de -0.5 a +1.1 V, 100 mV/s como rango de escaneo y 10 ciclos de escaneado. Mediante las curvas de CV, fue posible determinar la electroactividad (capacidad de almacenamiento de carga) y la electroestabilidad (perdida de electroactividad como consecuencia de ciclos de oxidación-reducción). Para esta última se aplicó la fórmula de la Ecuación 1.

$$LEA (\%) = \frac{\Delta Q}{Q_i} * 100 \quad \text{Ec. (1)}$$

Donde  $\Delta Q$  es la diferencia de carga (en C) entre el primero y el ultimo ciclo, y  $Q_i$  representa la carga correspondiente al primer ciclo.

### Grado de hinchamiento

Para determinar al grado de hinchamiento de los hidrogeles (SR, %), cada muestra se pesó antes y después de sumergirla en agua mili-Q quedando totalmente sumergida durante 30 minutos. La ratio de hinchamiento (SR, %) de los hidrogeles obtenidos fueron determinados siguiendo la Ecuación 2

$$SR(\%) = \frac{W_w - W_d}{W_d} * 100 \quad \text{Ec. (2)}$$

Donde  $W_w$  (mg) es el peso del hidrogel húmedo y  $W_d$  (mg) es el peso del hidrogel liofilizado y seco.

## 3.6. Caracterización del sensor

### Liberación de la vitamina K3

Se estudiaron tres tipos de hidrogeles de los seis sintetizados para el estudio de absorción y liberación de vitamina K3:  $\gamma$ -PGA,  $\gamma$ -PGA/K3, [ $\gamma$ -PGA-PEDOT/K3] PHMeEDOT; para así comparar la liberación de la vitamina K3 con el  $\gamma$ -PGA y con las nanopartículas electropolimerizadas. Se sumergieron tres muestras de cada tipo de hidrogel en 3 mL de PBS, estudiando así la liberación mediante absorbancia de los picos a un número de onda de 335 nm, que corresponde a la absorción de la vitamina K3, durante 15 días. Las muestras se conservaron durante este periodo en agitación a 80 rpm y una temperatura de 37°C. La liberación de la vitamina K3 se evaluó empleando un espectrofotómetro de UV-vis Cary 100 Bio, marca Varian (Figura 18), y por voltametría de pulso diferencial (DPV).



Figura 18. Espectrofotómetro modelo UV-vis Cary 100 Bio

### **Voltametría de pulso diferencial (DPV)**

Debido a su alta sensibilidad para análisis cuantitativos, la voltametría de pulso diferencial (DPV) se usó como método electroquímico para la detección de la vitamina K3. Los ensayos se realizaron con una celda con tres electrodos como la que se empleó en los ensayos de voltametría cíclica, descritos anteriormente. El rango de potencial aplicado fue de  $-0,3\text{ V}$  a  $+0,7\text{ V}$ ,  $80\text{ mV}$  como amplitud de modulación y un incremento de escaneo de  $2\text{ mV}$ . La modulación y el intervalo de tiempo fueron de  $0,05$  y  $40\text{ s}$ , respectivamente.

## 4. Resultados y discusión

Antes de empezar a explicar la caracterización de los materiales que se sintetizaron en este estudio y los resultados obtenidos con el sensor electroquímico, se debe hacer un breve resumen del objetivo del proyecto y la función de cada componente incorporado en el hidrogel.

Cabe destacar que es importante obtener partículas pequeñas de PEDOT porque los polímeros conductores tienen una elevada tendencia a aglomerarse en disolución y una vez solidificado, tras la evaporación del disolvente. Las partículas de PEDOT se dispersan mejor en otros materiales cuando está en forma microscópica o nanométrica. Por otro lado, se ha elegido el PEDOT como polímero de nucleación para la posterior polimerización electroquímica del PHMeEDOT, debido a que facilita la formación de cargas (polarones o bipolarones) en sus cadenas y, consecuentemente, el crecimiento del otro polímero alrededor suyo; creando así una red conductora dentro del hidrogel. La dispersión de las NPs de PEDOT en el hidrogel de  $\gamma$ -PGA se discutirá más adelante.

La electropolimerización empleando un derivado del PEDOT, el PHMeEDOT, ha sido ideada para crear un material conductor hidrofílico capaz de interactuar con el hidrogel, gracias a la presencia de los grupos  $-OH$ ; obteniendo así, un material híbrido compuesto por un polímero blando, como es el caso del  $\gamma$ -PGA, completamente flexible; y un polímero semiconductor, como es el caso del conjunto PEDOT y PHMeEDOT.

### 4.1. Caracterización de las nanopartículas PEDOT

Mediante la espectroscopia infrarroja se ha identificado la composición química de las NPs de PEDOT sintetizadas químicamente. Además, se ha determinado la morfología y el tamaño de las NPs PEDOT con SEM y DLS, respectivamente.

La comparación del espectro FTIR del monómero EDOT y su homopolímero se muestra en la Figura 19. En el monómero se observan bandas a  $3190$  y  $772\text{ cm}^{-1}$  que corresponden al grupo  $CH^{\alpha}$  de tensión y vibraciones fuera del plano, respectivamente. La ausencia de estas dos bandas en el espectro del PEDOT indica que los átomos de hidrógeno en la posición  $CH^{\alpha}$  fueron eliminados durante la polimerización, lo que indica que el crecimiento de la cadena del polímero ocurre a través de estas posiciones. Otros grupos característicos son el anillo tiofeno, los cuales se presentan en las bandas a  $1643\text{-}1553\text{ cm}^{-1}$ , y se corroboran con la región a  $681\text{ cm}^{-1}$  donde aparece la tensión del enlace C-S; las bandas vibracionales del grupo característico etilenodioxo (grupo éter) asociadas a tensión C-O-C ( $1233\text{-}1053\text{ cm}^{-1}$ ). Además, el espectro del homopolímero muestra picos relacionados con el alcano del ácido dodecibencensulfónico con picos entre  $2863\text{-}2917\text{ cm}^{-1}$  (grupos de tensión  $CH_3$ ,  $CH_2$  y  $CH$ ). La

presencia de la banda a  $1771\text{ cm}^{-1}$  puede indicar la existencia de grupos carbonilo, que estaría relacionado con la sobreoxidación del polímero, aunque el EDOT tiene 3,4- anillos del tiofeno disustituidos que se puede pensar que no hay sitios libres para la formación del carbonilo; el pico  $1693\text{ cm}^{-1}$  confirma que la sobreoxidación tuvo lugar debido al APS, probablemente. (Saborío et al. 2018).

La espectroscopia infrarroja es una buena herramienta para detectar los diferentes grupos funcionales. Todo y que aparecen bandas no deseadas, se puede concluir que el polímero se ha obtenido con éxito, ya que sus bandas características están presentes en el espectro de FT-IR (Figura 19).

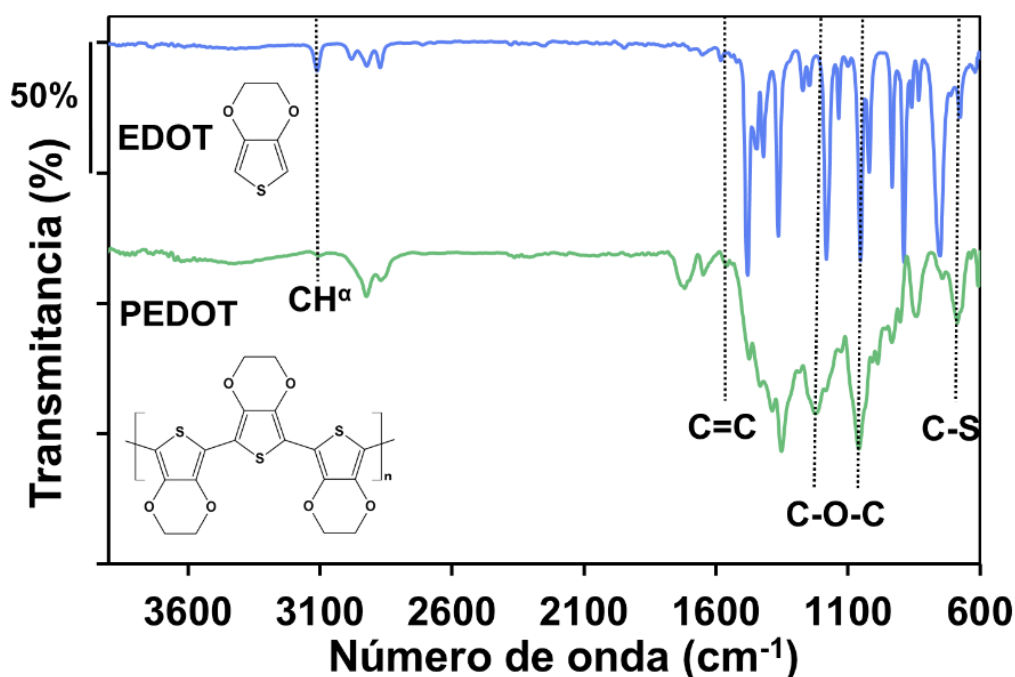


Figura 19. Espectro infrarrojo del monómero EDOT y del homopolímero PEDOT obtenido por síntesis química

Como la intención es añadir partículas de PEDOT muy pequeñas al hidrogel, la determinación del tamaño de partícula es esencial para continuar con el estudio. Para ello, se empleó tanto la técnica de SEM como la DLS. La micrografía SEM de las nanopartículas PEDOT se muestra en la Figura 20, donde se pueden observar agregados con una morfología de tipo coral. Tal como se comentó anteriormente, es un material que tiene una elevada tendencia a aglomerarse debido a la presencia de cargas en la cadena polimérica. Las partículas aisladas que se detectaron por SEM parecen esféricas y poseen un diámetro efectivo ( $D_{\text{eff}}$ ) de  $48.2 \pm 1.1$  y  $91.4 \pm 0.2$  nm, según lo determinado por dispersión de luz dinámica (DLS) y microscopía electrónica de barrido, respectivamente. Esta gran diferencia entre las dos medidas se debe a que en disolución, que es como se mide el tamaño de partícula con un equipo de DLS, el polímero presenta más facilidad de dispersión y, por tanto, el resultado es más coherente comparado con las muestras de SEM, que están secas y depositadas sobre una superficie plana.

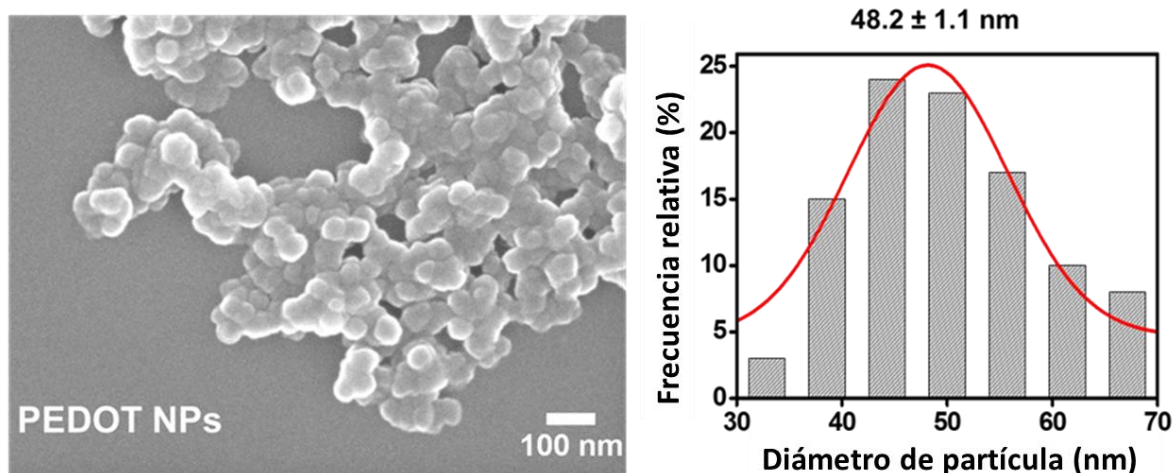


Figura 20. Imágenes del SEM de NPs PEDOT e histograma del diámetro efectivo derivado de la medición del SEM

## 4.2. Caracterización del hidrogel de $\gamma$ -PGA cargado con nanopartículas PEDOT generado químicamente

Una vez caracterizadas y añadidas las partículas de PEDOT al hidrogel, estos fueron nuevamente caracterizados por espectroscopia infrarroja (FT-IR).

En la Figura 21 se observan las imágenes de los filmes de hidrogeles de  $\gamma$ -PGA puro, hidrogel con vitamina K3 ( $\gamma$ -PGA/K3), hidrogel con NPs de PEDOT ( $\gamma$ -PGA-PEDOT) e hidrogel con PEDOT y vitamina K3 ( $\gamma$ -PGA-PEDOT/K3), preparados en este estudio. Las imágenes se realizaron mediante microscopia digital. A escala macroscópica, se observa que tanto la vitamina K3 como las nanopartículas PEDOT tienen un buen acoplamiento con la matriz de  $\gamma$ -PGA, ya que al añadirle la vitamina K3, el hidrogel adquiere su coloración (color amarillo), y, al añadirle las nanopartículas PEDOT, el  $\gamma$ -PGA es de color negro, color característico de los CPs dopados. Seguidamente, se exponen diferentes caracterizaciones de los hidrogeles obtenidos para comprobar su composición química.

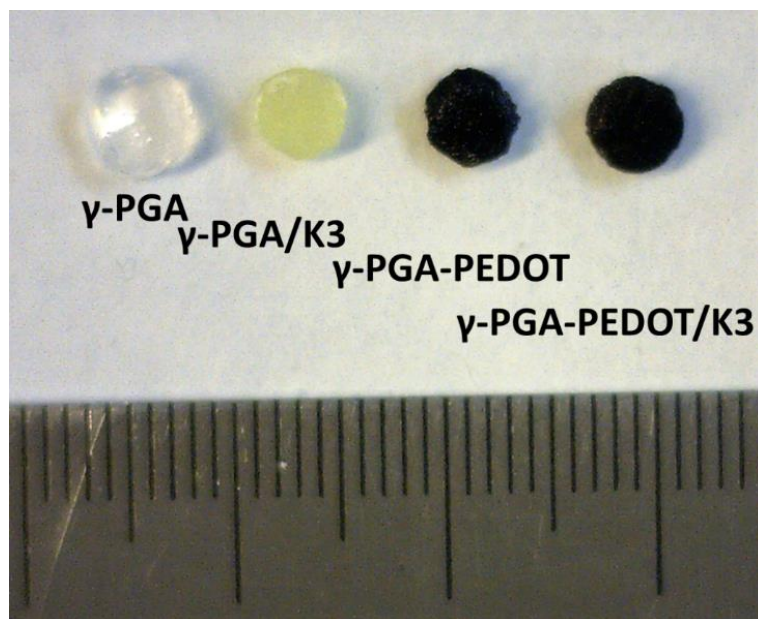


Figura 21. Imagen del microscopio digital Dino-Lito de los hidrogeles obtenidos. La escala más pequeña de la regla corresponde a 1 mm.

La caracterización espectroscópica de los hidrogeles obtenidos se realizó por FTIR y UV-vis, observando así los grupos funcionales y las bandas de absorción de los compuestos, respectivamente. Son técnicas que se usaron para comprobar si las nanopartículas de PEDOT y la vitamina K3 tuvieron un buen acoplamiento a la matriz del hidrogel de  $\gamma$ -PGA.

### Espectroscopia infrarroja (FT-IR)

La Figura 22 compara el espectro FT-IR de los hidrogeles sintetizados,  $\gamma$ -PGA y  $\gamma$ -PGA-PEDOT. Tanto en el  $\gamma$ -PGA como en el  $\gamma$ -PGA-PEDOT se observan bandas de absorción muy anchas en  $3293\text{ cm}^{-1}$ , que deben estar asociadas a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxil ( $-\text{OH}$ ) y los grupos amida ( $\text{CO-NH}$ ,  $3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ ). Tales bandas de estiramiento se comprueban con las bandas de deformación de la amida primaria y la amida secundaria, que se muestran en las zonas de  $1638\text{ cm}^{-1}$  y  $1535\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. En el espectro  $\gamma$ -PGA-PEDOT, también se observaron grupos característicos del PEDOT como son el anillo tiofeno fundamental, en las vibraciones a  $1643\text{-}1553\text{ cm}^{-1}$ , y en la banda a  $681\text{ cm}^{-1}$ , indicativa de la tensión C-S. (Pérez-Madrigal et al. 2017)

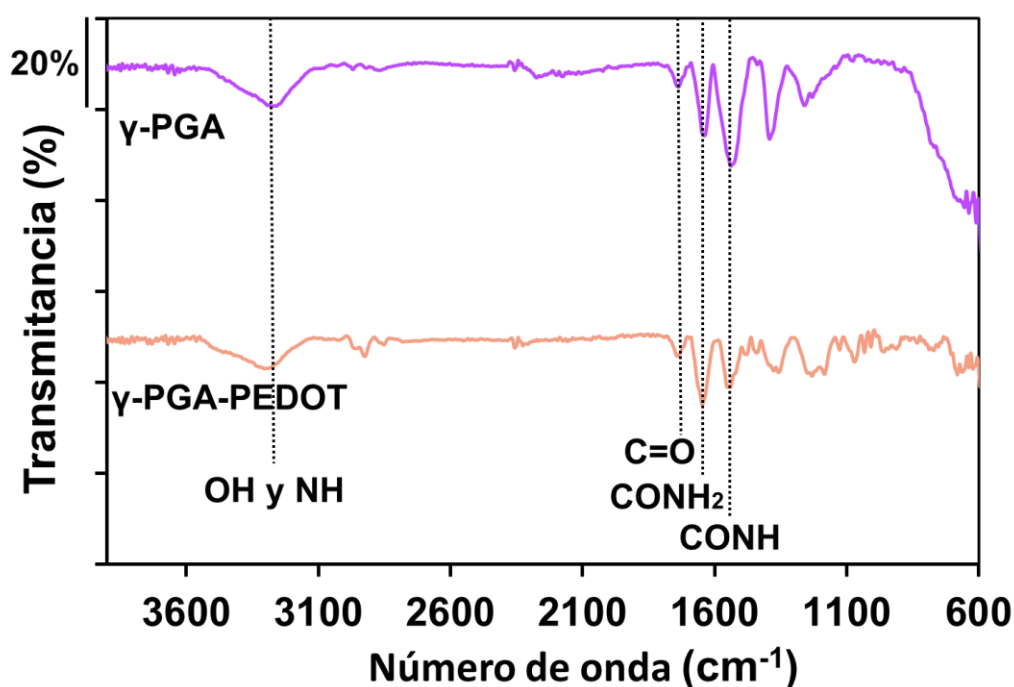


Figura 22. Espectro infrarrojo de los hidrogeles  $\gamma$ -PGA,  $\gamma$ -PGA-PEDOT

En la Figura 23 se muestra la comparación de los espectros FT-IR de la vitamina K3 y los hidrogeles  $\gamma$ -PGA/K3 y  $\gamma$ -PGA-PEDOT/K3. Se observan las bandas características del  $\gamma$ -PGA que han sido previamente mencionadas. Sin embargo, en el compuesto  $\gamma$ -PGA-PEDOT/K3, no se puede distinguir entre el C=O de la amida primaria (también conocida como Amida I), con el C=O de la cetona presente en la vitamina K3. Tampoco la forma de las bandas es la misma, en la vitamina K3, esta banda es aguda y fuerte, en la del polímero suele ser más ancha. Tampoco se ha podido distinguir por IR, si el grupo C=C del anillo aromático en la banda a  $1600\text{ cm}^{-1}$  de la vitamina K3 se observa también en el compuesto híbrido,  $\gamma$ -PGA-PEDOT/K3; ya que este contiene un polímero conjugado, cuya principal característica es la presencia de enlaces C=C alternados con enlaces C-C simples. Pero cabe destacar que el hidrogel de  $\gamma$ -PGA puro no contiene enlaces dobles C=C libres o conjugados y que estos si se observan a  $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$  en el espectro del híbrido de  $\gamma$ -PGA/K3; además de las bandas de amida I y II (Tabla 2). (Mac y Wirz 2002) Por tanto, solo podría venir de la molécula de K3 y que corroboraría con la eficaz incorporación de estas moléculas dentro del hidrogel.

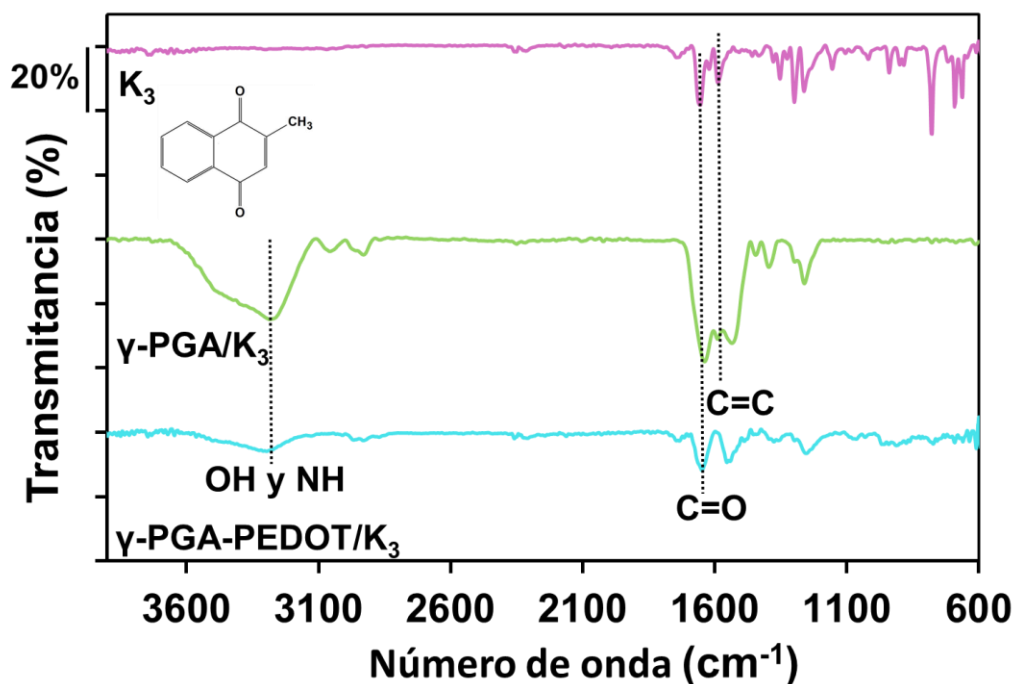


Figura 23. Espectro infrarrojo de la vitamina K3 y los hidrogeles de  $\gamma$ -PGA/K3,  $\gamma$ -PGA-PEDOT/K3.

Por tanto, se puede concluir que la técnica de FT-IR es ideal para ver las bandas de absorción de grupos polares, cuyas señales salen intensas y agudas en el espectro, pero sin embargo, ha sido difícil de interpretarla cuando aparecen bandas de absorción apolares, como es el caso de C=C o poco polares como los enlaces C-H o C-S. Para los próximos estudios sería conveniente emplear la técnica de espectroscopia Raman, que, además de detectar enlaces apolares, es más sensible a las bajas concentraciones de sustancias gracias a la posibilidad de emplear mapeamientos de zonas específicas, empleando el microscopio óptico para tales fines.



Tabla 2. Asignación de las principales bandas de absorción del espectro infrarrojo ( $\text{cm}^{-1}$ )

Número de onda vibracional ( $\text{cm}^{-1}$ )					
PEDOT	$\gamma$ -PGA	K3	$\gamma$ -PGA-PEDOT	$\gamma$ -PGA-PEDOT/K3	Grupos funcionales
681					C-S grupo de tensión
1233-1053					C-O-C grupo éter
2917-2863					$\text{CH}_3$ , $\text{CH}_2$ , CH
1771					C=O grupo carbonilo
	3293				O-H grupo hidroxilo
	1728				C=O grupo éster
	1638				C=O-N-H <sub>2</sub> amida primaria (Amida I)
	1535				C=O-N-H amida secundaria (Amida II)
	1215				C-N de flexión
		1680-1645			C=O grupo cetona
		1600			C=C doble enlace
			3293		O-H grupo hidroxilo
			1638		C=O-N-H <sub>2</sub> amida primaria
			1535		C=O-N-H amida secundaria
			680		C-S grupo de tensión
			779		C-H aromático
				~3400	O-H grupo hidroxilo
				~3200	N-H grupo amida
				1638	C=O-NH <sub>2</sub> amida primaria
				1535	C=O-NH amida secundaria

## Espectroscopia ultravioleta visible (UV-vis)

La espectroscopia de UV-vis es una técnica mucho más sensible a concentraciones bajas de moléculas que la técnica de FT-IR, sea en un medio líquido o, más recientemente, en sólidos. En sólidos, sobretodo, debido en parte al desarrollo de accesorios mucho más sofisticados para recoger la intensidad de la señal transmitida o difractada.

En la Figura 24 se compara el espectro de UV-vis del PEDOT y de los hidrogeles  $\gamma$ -PGA-PEDOT. Como se observa, el espectro del PEDOT tiene una banda de absorción intensa entre 650 y 750 nm debido a la banda polarónica de la forma conductora quinoidea del polímero conductor, como las que se muestran en la Figura 25. Sin embargo, en el hidrogel  $\gamma$ -PGA-PEDOT esta banda se ve bastante disminuida. Por lo tanto, si se magnifica esta zona de longitud de onda comprendida entre 650-750 nm (figura insertada en el espectro), se podría decir que hay algo de acoplamiento del PEDOT en la matriz del  $\gamma$ -PGA (curvas de colores azul y rojo), aunque su concentración sea mínima. (Fabregat y Alemán 2014)

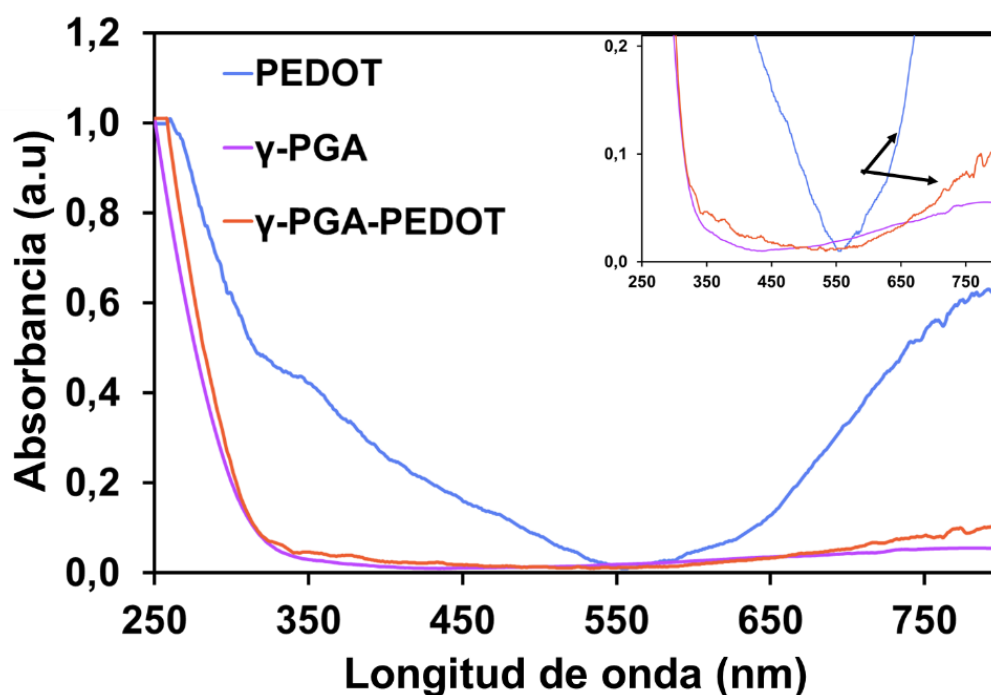


Figura 24. Espectro UV-vis del PEDOT y de los hidrogeles  $\gamma$ -PGA y  $\gamma$ -PGA-PEDOT

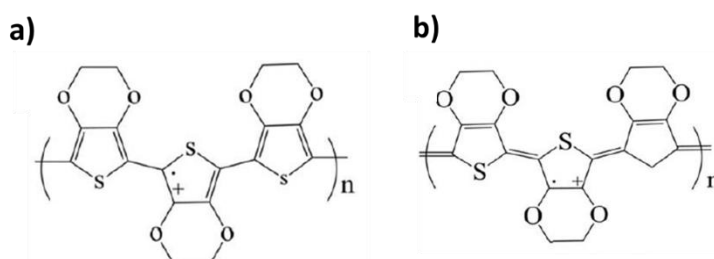


Figura 25. Forma del PEDOT benzenoide a) Forma del PEDOT quinoide (Wang et al. 2017)

Es relevante mencionar que la carga dopante del PEDOT (el DBSA), que es el responsable por la formación de los radicales polarones en el CP, no es muy estable y se desconfía que una parte puede haberse eliminado por disolución y neutralización en el proceso de preparación del hidrogel. Es un proceso que se hace además con aumento de la temperatura. Por tanto, habría que interpretar con cuidado los resultados obtenidos arriba.

En la Figura 26 se muestra una comparación de los espectros UV-vis de la vitamina K3 y los hidrogeles de  $\gamma$ -PGA/K3 y  $\gamma$ -PGA-PEDOT/K3. Se observan dos bandas características correspondientes a la vitamina K3 en los picos de absorción de 335 nm y 425 nm debido a la transición electrónica  $\pi$ - $\pi$  de los anillos aromáticos. También cabe destacar que en el hidrogel de  $\gamma$ -PGA-PEDOT/K3, se observa la banda de absorción comentada en la Figura 24, correspondiente al material dopado (presencia de polarones), si se observa la gráfica maximizada dentro de la Figura 26. Adicionalmente, en los dos hidrogeles, aunque sea en menor medida, se observan las bandas de absorción de la vitamina K3, por lo tanto se deduce que hay un buen acoplamiento de esta en la matriz del  $\gamma$ -PGA. (Demchuk et al. 2014)

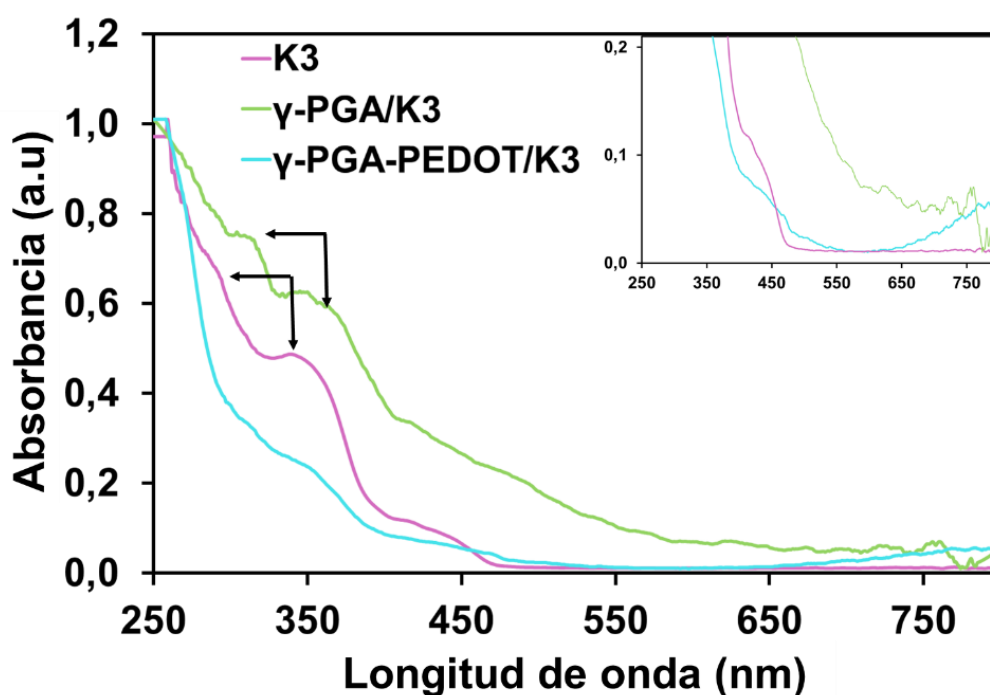


Figura 26. Espectro UV-vis de la K3 y los hidrogeles PGA/K3 y PGA-PEDOT/K3

## Microscopía electrónica de barridos (SEM)

El estudio del cambio de la morfología de los diferentes hidrogeles se hizo mediante SEM.

En la Figura 27 se observan las micrografías SEM de los hidrogeles obtenidos. La primera micrografía del  $\gamma$ -PGA, superficial y transversal, muestra una estructura porosa del hidrogel  $\gamma$ -PGA, con el tamaño de poros irregulares. Se observa que la estructura del  $\gamma$ -PGA-PEDOT posee una porosidad similar pero, en este caso, con agregados de nanopartículas PEDOT dispersadas por la matriz del biopolímero (Figura 27, figura de la derecha). La buena dispersión de las nanopartículas PEDOT en la matriz biopolimérica se atribuye a las imágenes de SEM de corte transversal del film de  $\gamma$ -PGA-PEDOT. La estructura del hidrogel  $\gamma$ -PGA-PEDOT/K3 es similar a la del  $\gamma$ -PGA-PEDOT pero en la micrografía a mayor aumento se observa como la vitamina K3 al ser hidrófoba tiende a agruparse alrededor de las nanopartículas de PEDOT, formando una pequeña coraza alrededor de estas, como se señala en la imagen.

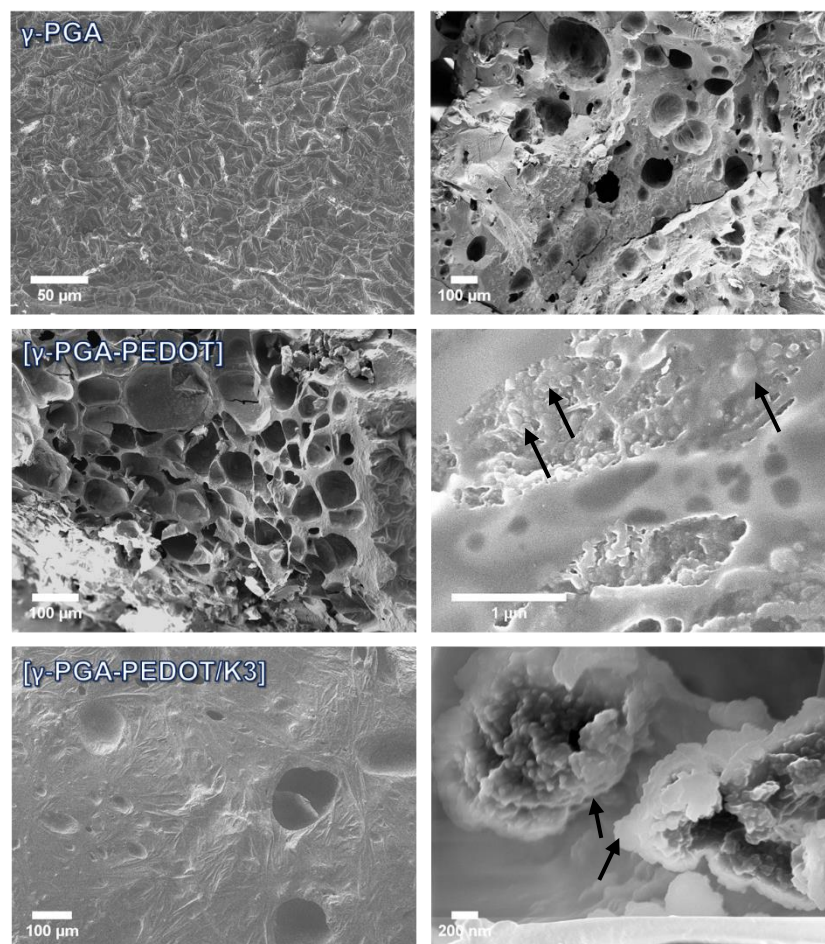


Figura 27. Micrografías SEM de los hidrogeles de  $\gamma$ -PGA,  $\gamma$ -PGA-PEDOT y  $\gamma$ -PGA-PEDOT/K3.

Todo y que los polímeros sintetizados en el presente estudio fueron difíciles de caracterizar, debido a la presencia de numerosos grupos funcionales en los distintos componentes, se decidió seguir adelante con la preparación del sensor electroquímico de  $[\gamma$ -PGA-PEDOT] PHMeEDOT.

### 4.3. Síntesis y caracterización de un material híbrido compuesto por [ $\gamma$ -PGA-PEDOT] PHMeEDOT

A continuación, se expone cómo se ha determinado el potencial para la electropolimerización de los hidrogeles de  $\gamma$ -PGA-PEDOT y  $\gamma$ -PGA-PEDOT/K3, mediante voltametría cíclica (CV) y cronoamperometría (CA).

La Figura 28a muestra una CV del sustrato PET/ITO en presencia de la disolución electrolítica, que contiene el  $\text{LiClO}_4$ , y otra CV que contiene el electrolito y la solución del monómero (HMeEDOT), ambos en medio acuoso. Esta técnica se realizó para determinar el potencial óptimo para la posterior generación de PHMeEDOT en hidrogeles. Se observa como el PET/ITO con la solución electrolítica da una señal pequeña comparada con la señal del sustrato en la misma solución. Esto es debido a que el PET/ITO es un material conductor, pero cuando se le añade el monómero la señal de densidad de corriente aumenta, ya que hay más material con el que se produce la reacción de oxidación-reducción. Se determinó que se le debe aplicar un potencial de +1,1 V debido a que es el valor de potencial en el que se produce la oxidación del monómero. Además, si se pusiera un potencial más alto al ser una solución acuosa, el agua también se oxidaría (potencial estándar de reducción,  $E^0 = +1.23\text{V}$ ).

La Figura 28b muestra una CA en la que se compara el tiempo que tardan en llegar a un valor de carga eléctrica  $Q$  de 20 mC/0,9 cm<sup>3</sup>. Se observa como el [ $\gamma$ -PGA-PEDOT/K3] PHMeEDOT tarda más tiempo que el compuesto [ $\gamma$ -PGA-PEDOT] PHMeEDOT en alcanzar el valor de  $Q$  mencionado anteriormente. Esto es debido a la incorporación de una molécula orgánica pequeña y no eléctricamente cargada, como la vitamina K3, que obstaculiza el crecimiento de la cadena en el seno del hidrogel.

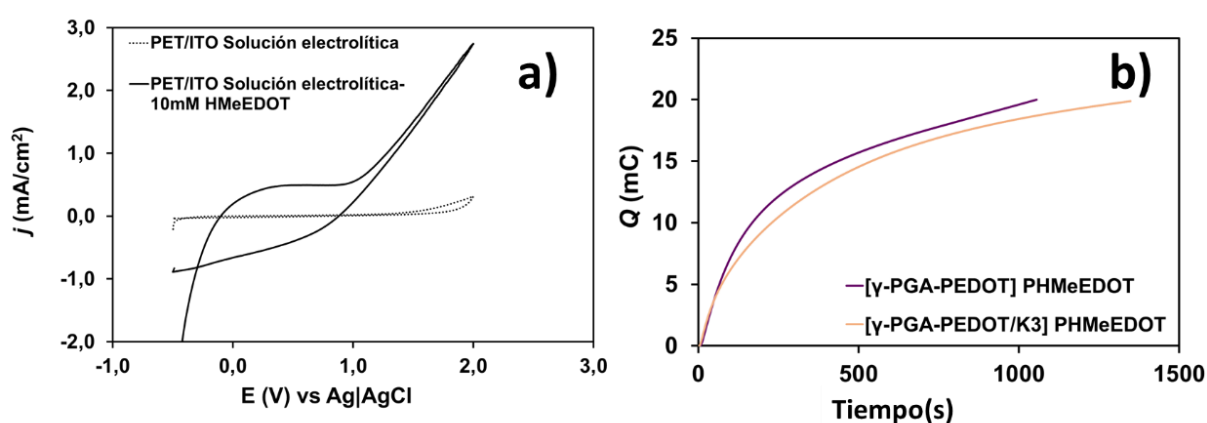


Figura 28. (a) Voltametría cíclica de un filme flexible de PET/ITO, empleado como sustrato de electrodo de trabajo; y (b) cronoamperometría de un filme compuesto por PET/ITO como sustrato y dos filmes diferentes de hidrogeles.

En la Figura 29 se observa como el hidrogel se ha depositado en el sustrato de PET/ITO, después de la electropolimerización. Las dimensiones de los hidrogeles obtenidos son de  $4 \times 4 \text{ cm}^2$ , que se dividen en ocho partes de  $4 \times 0,5 \text{ cm}^2$  de área, para posteriores caracterizaciones físico-químicas. En la Figura 29 se puede observar como el hidrogel polimerizado aún mantiene un grado de flexibilidad importante, ya que es posible doblarlo sin observar ninguna ruptura microscópica (evaluada por microscopía digital, microscopio Dino-Lite).

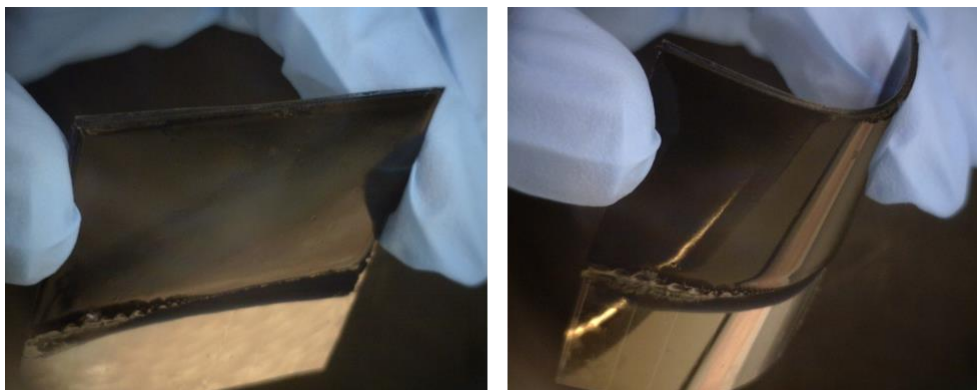


Figura 29. Hidrogeles de  $[\gamma\text{-PGA-PEDOT}] \text{ PHMeEDOT}$  y  $[\gamma\text{-PGA-PEDOT/K3}] \text{ PHMeEDOT}$

En la Tabla 3 se compara el peso de los hidrogeles una vez transcurridas 12h de absorción en la solución que contiene el monómero HMeEDOT y después de la electropolimerización. Se observa como en ambos hidrogeles el peso aumenta después de la electropolimerización. Con este aumento se puede decir, por lo tanto, que la electropolimerización se ha realizado con éxito. Las cadenas del polímero PHMeEDOT hacen aumentar el peso de los hidrogeles a un valor de 0,10 y 0,17 g  $[\gamma\text{-PGA-PEDOT}] \text{ PHMeEDOT}$  y  $[\gamma\text{-PGA-PEDOT/K3}] \text{ PHMeEDOT}$ , respectivamente.

Tabla 3. Pesos hidrogeles  $[\gamma\text{-PGA-PEDOT}] \text{ PHMeEDOT}$  y  $[\gamma\text{-PGA-PEDOT/K3}] \text{ PHMeEDOT}$

Muestra	$W_{\text{HMeEDOT}} \text{ (g)}$	$W_{\text{PHMeEDOT}} \text{ (g)}$
<b><math>[\gamma\text{-PGA-PEDOT}] \text{ PHMeEDOT}</math></b>	$1,1785 \pm 0,0577$	$1,28039 \pm 0,0076$
<b><math>[\gamma\text{-PGA-PEDOT/K3}] \text{ PHMeEDOT}</math></b>	$1,1187 \pm 0,0101$	$1,2949 \pm 0,1437$



Para determinar si hay alguna diferencia en los grupos funcionales de los hidrogeles electropolimerizados, se ha empleado nuevamente la espectroscopia infrarroja.

Antes, se ha realizado el espectro infrarrojo del monómero HMeEDOT (hidroximetil (3,4-etilendioxitiofeno) y el PHMeEDOT Poli (hidroximetil-3,4-etilenedioxitiofeno). Se observa la banda correspondiente al grupo hidroxil en  $3600\text{ cm}^{-1}$ , grupos característicos del PHMeEDOT y su homopolímero HMeEDOT. Cabe destacar que se encuentran las bandas presentes de los grupos del EDOT y PEDOT anteriormente mencionadas.

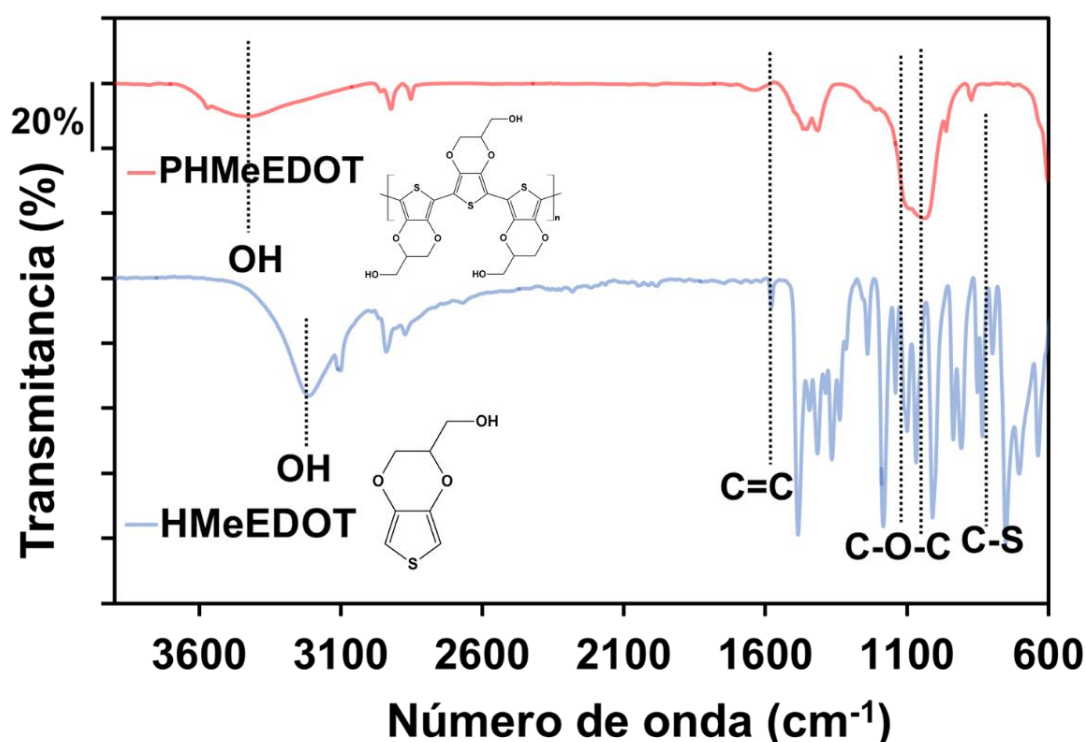


Figura 30. Espectro infrarrojo del PHMeEDOT y el HMeEDOT

En la Figura 31 se observa la comparación de los espectros de FT-IR de los hidrogeles  $[\gamma\text{-PGA-PEDOT}]$  PHMeEDOT y  $[\gamma\text{-PGA-PEDOT/K3}]$  PHMeEDOT. Se observa como las bandas de absorción son similares a los de los hidrogeles sin electropolimerizar. La diferencia que se muestra es que la intensidad de los picos, sobretodo la del grupo hidroxil (-OH) y amida (CO-NH) a  $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ , es mayor que los de los hidrogeles sin electropolimerizar.

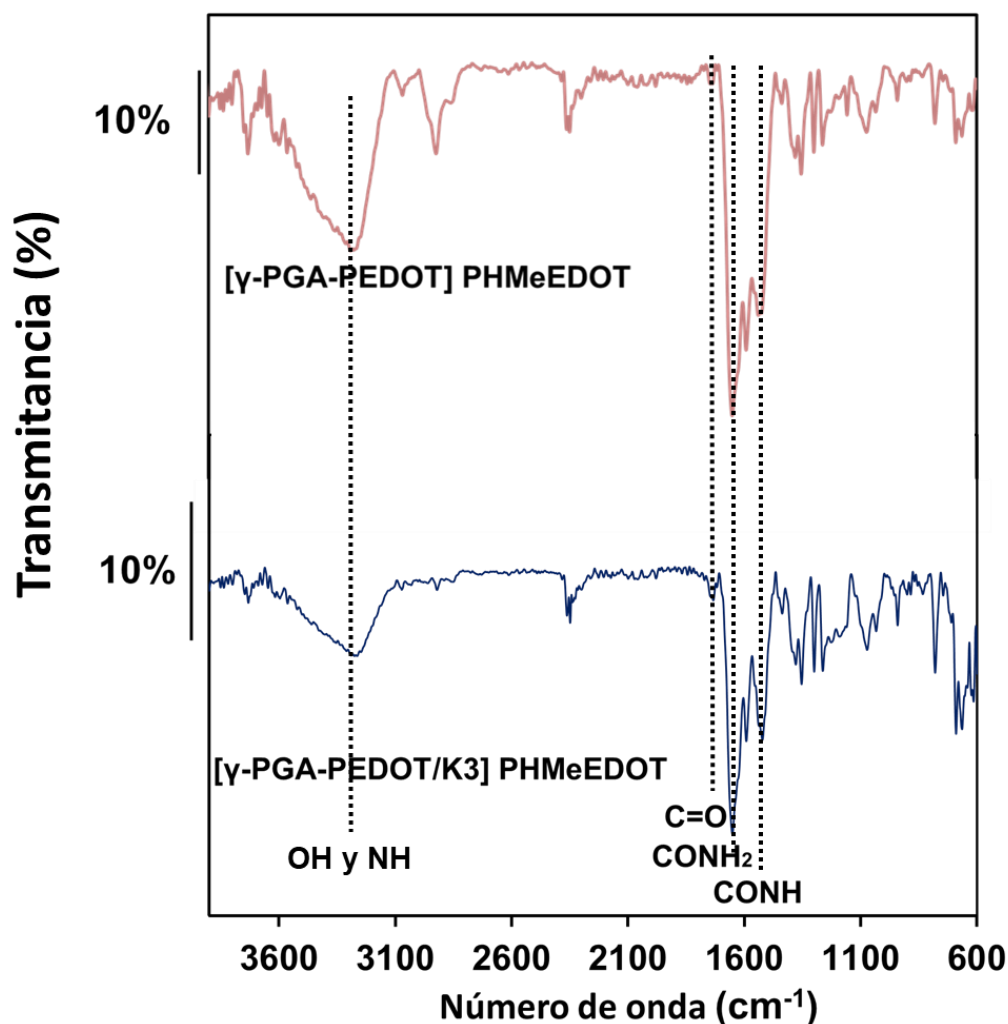


Figura 31. Espectro infrarrojo de los hidrogeles  $[\gamma\text{-PGA-PEDOT}]$  PHMeEDOT y  $[\gamma\text{-PGA-PEDOT/K3}]$  -PHMeEDOT.

A continuación, se describirá el análisis morfológico determinado por SEM, para los hidrogeles con PHMeEDOT electropolimerizado en la matriz del hidrogel de  $\gamma$ -PGA-PEDOT.

En la Figura 32 se observan los hidrogeles electropolimerizados, en ambos casos  $[\gamma\text{-PGA-PEDOT}]$  PHMeEDOT y  $[\gamma\text{-PGA-PEDOT/K3}]$  PHMeEDOT, en la que se mantiene la porosidad característica del hidrogel de  $\gamma$ -PGA, observada anteriormente. Sin embargo, en las micrografías a mayores aumentos se puede observar como las nanopartículas de PEDOT han sido recubiertas por el PHMeEDOT. Se puede ver como su morfología esférica cambia y como este resultado corrobora así nuestra predicción inicial de que las nanopartículas de PEDOT sirven como puntos de nucleación. En estos puntos es donde se comienza el proceso de la electropolimerización del PHMeEDOT (Saborío et al. 2018). Por otra parte, al crecer la cadena de PHMeEDOT alrededor de las nanopartículas de PEDOT también esta recubre la vitamina K3 en el hidrogel  $[\gamma\text{-PGA-PEDOT/K3}]$  PHMeEDOT, atrapándolas dentro del sistema.



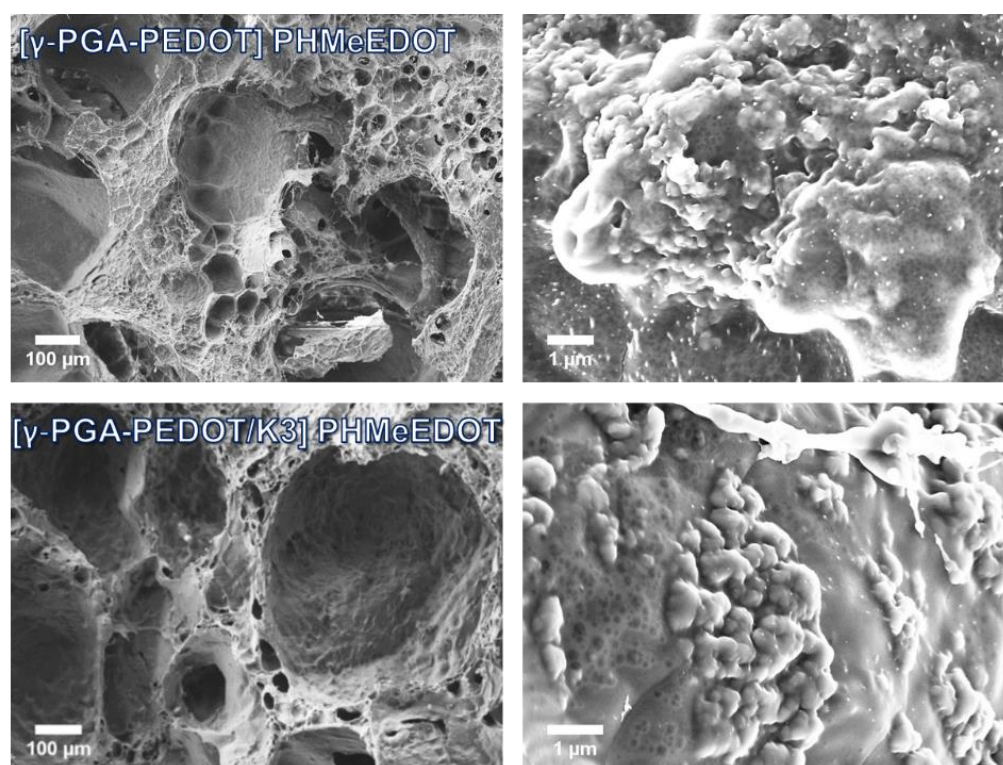


Figura 32. Micrografía SEM de los hidrogeles de  $[\gamma\text{-PGA-PEDOT}] \text{PHMeEDOT}$  y  $[\gamma\text{-PGA-PEDOT/K3}] \text{PHMeEDOT}$  (corte transversal y visualización a mayor aumento óptico).

### Voltametría cíclica (CV)

Se realizó la caracterización electroquímica de los hidrogeles obtenidos mediante voltametría cíclica, una vez electropolimerizado el CP derivado del PEDOT, y que contiene grupos polares (-OH) en su cadena lateral. Este estudio se hace para comparar factores característicos de los CPs, como: la **electroactividad**, la **electroestabilidad** y obtención de los **picos de oxidación** por los voltamperogramas.

La Figura 33a compara la voltametría cíclica de los seis tipos de hidrogeles sintetizados. La capacidad de almacenamiento de carga (electroactividad) de los hidrogeles  $[\gamma\text{-PGA-PEDOT}] \text{PHMeEDOT}$  y  $[\gamma\text{-PGA-PEDOT/K3}] \text{PHMeEDOT}$  es mayor que la de los mismos sin electropolimerizar porque, según se observa en los voltamperogramas obtenidos, su área es mayor. Este hecho verifica que el PHMeEDOT se ha electropolimerizado con éxito, siendo el PEDOT el punto de nucleación y crecimiento de la cadena de PHMeEDOT. Además, en el voltamperograma del hidrogel de  $[\gamma\text{-PGA-PEDOT/K3}] \text{PHMeEDOT}$  se puede observar un pico de oxidación a un potencial de 0,3 V que correspondería a la oxidación de la vitamina K3.

En la Figura 33b se compara el valor de la pérdida de la electroestabilidad, después de 10 ciclos consecutivos de oxidación-reducción para los hidrogeles  $[\gamma\text{-PGA-PEDOT}]$  PHMeEDOT y  $[\gamma\text{-PGA-PEDOT/K3}]$  PHMeEDOT. Se observa que el comportamiento entre ambos es muy similar, sin embargo, el film de  $[\gamma\text{-PGA-PEDOT}]$  PHMeEDOT es ligeramente menos estable, disminuyendo un 20% su electroestabilidad tras 10 ciclos de CVs, mientras que el hidrogel de  $[\gamma\text{-PGA-PEDOT/K3}]$  PHMeEDOT pierde un 16%.

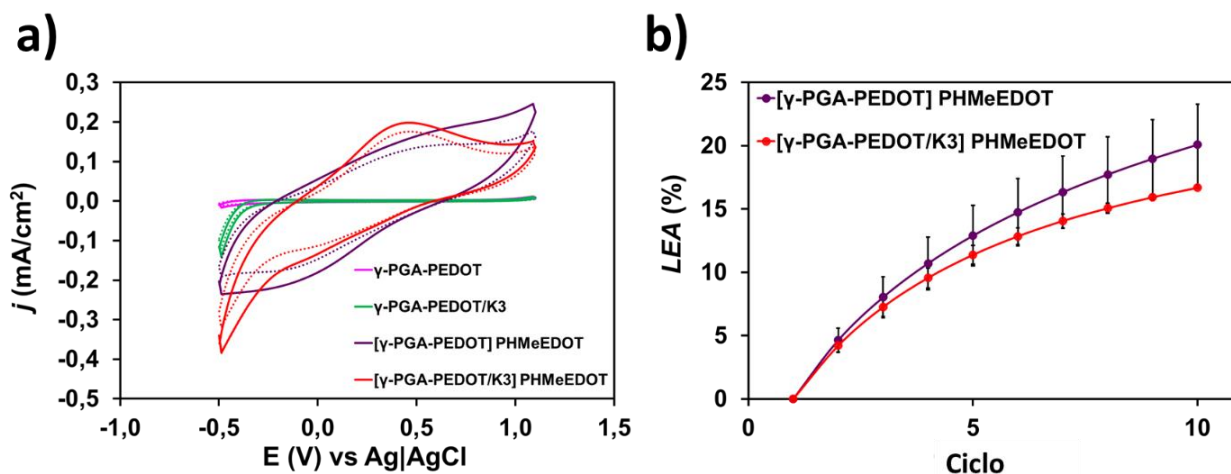


Figura 33. Voltametrías cíclicas de los hidrogeles (a) Voltamperogramas del primer ciclo (línea continua) y del décimo ciclo (línea discontinúa); y (b) comparación de la variación de LEA de los hidrogeles  $[\gamma\text{-PGA-PEDOT}]$  PHMeEDOT y  $[\gamma\text{-PGA-PEDOT/K3}]$  PHMeEDOT.

### Grado de hinchamiento (SR %)

Se evalúa el grado de hinchamiento de los seis tipos de hidrogeles obtenidos para comparar la capacidad que tiene cada uno de ellos para retener el agua. Esta propiedad es importante de cara a la incorporación de este sistema en el organismo vivo y la posterior liberación de drogas y/o sustancias, como el caso de las vitaminas; para diversas situaciones médicas.

Los resultados después de haber pesado las diferentes muestras antes y después de sumergirlas en agua mili-Q, durante 30 minutos, se muestran en Tabla 4.

Tabla 4. Resultados obtenidos del grado de hinchamiento

Muestra	SR (%)
$\gamma\text{-PGA}$	$408,4 \pm 170,2$
$\gamma\text{-PGA-PEDOT}$	$487,9 \pm 254,4$
$\gamma\text{-PGA/K3}$	$623,5 \pm 81,3$
$\gamma\text{-PGA-PEDOT/K3}$	$931,9 \pm 375,4$
$[\gamma\text{-PGA-PEDOT}]$ PHMeEDOT	$921,9 \pm 91,8$
$[\gamma\text{-PGA-PEDOT/K3}]$ PHMeEDOT	$1711,2 \pm 82,4$

Los hidrogeles, en su propia definición, son sustancias capaces de absorber una gran cantidad de agua, sin disolverse en ella. Observando los resultados reportados en la Tabla 4 se puede comprobar que, efectivamente, cualquiera de los hidrogeles sintetizados posee una elevada capacidad de hinchamiento en agua. El hidrogel de  $\gamma$ -PGA puro tiene un grado de hinchamiento alto y, se puede comprobar que la incorporación de las nanopartículas de PEDOT no tiene un efecto negativo en esta propiedad. Adicionalmente, los hidrogeles electropolimerizados tienen un grado de hinchamiento todavía mayor que los no electropolimerizados. Esto puede ser debido a la naturaleza hidrofílica del PHMeEDOT y que el grado de entrecruzamiento después de la polimerización es menor. (Pérez-Madrigal et al. 2017)

Por último, cabe mencionar que el error obtenido en las medidas realizadas por pesada es extraordinariamente elevado en algunos casos debido a la dificultad de trabajar con un material altamente poroso, como es el caso del  $\gamma$ -PGA.

### **Liberación de vitamina K3**

En este apartado se comparan los hidrogeles de  $\gamma$ -PGA,  $\gamma$ -PGA/K3, y [ $\gamma$ -PGA-PEDOT/K3] PHMeEDOT con el fin de estudiar el efecto de los diferentes componentes del sistema híbrido en la liberación de la vitamina K3, mediante absorción y aplicación de voltametría de pulso diferencial (DPV) para la detección de la cantidad de vitamina retenida o liberada en el hidrogel tras la electroestimulación del film.

En la Figura 34 se muestra la liberación de la vitamina K3 en PBS. La medición se realizó mediante la observación del valor de la absorbancia, a una longitud de onda de 335 nm. La curva patrón correspondiente, con concentraciones de vitamina K3 de 0 a 1mM, se encuentra en la Figura 34b. Los resultados indican que el hidrogel de [ $\gamma$ -PGA-PEDOT/K3] PHMeEDOT, después de solo 24 h sumergido en PBS, ha liberado 0,9 mM de vitamina K3 mientras que el  $\gamma$ -PGA/K3 ha liberado 0,4 mM de vitamina K3. Considerando que por cada muestra de hidrogel había 0,0125 M de vitamina K3 los valores de liberación obtenidos son óptimos.

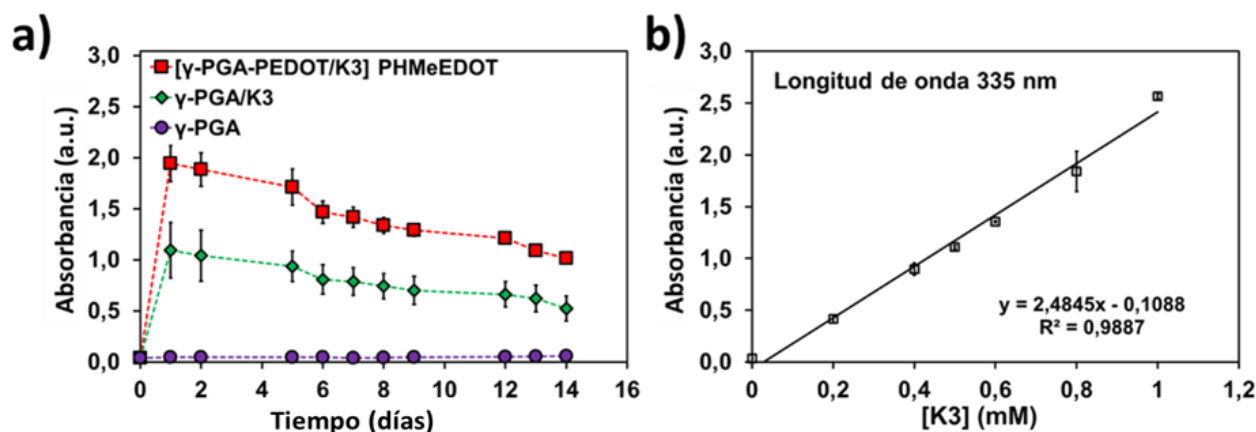


Figura 34. Liberación de vitamina K3 en PBS 0,1M (pH 7,4). Espectro UV-vis medido a una longitud de onda de 335 nm, (b) curva patrón con concentraciones de vitamina K3 de 0 a 1 mM.

Por otra parte, mediante experimentos electroquímicos (DPV), se detectó la cantidad de vitamina K3 remanente en los hidrogeles después de 1, 3 y 7 días sumergidos en PBS 0,1M (pH 7,4). Similar a los resultados obtenidos por UV-vis, ambos hidrogeles, γ-PGA/K3 (a) y [γ-PGA-PEDOT/K3] PHMeEDOT (b), presentan un comportamiento de liberación muy parecidos, resaltando que la mayor liberación se produce en las primeras 24 horas. La intensidad de la señal es muy superior para el hidrogel electropolimerizado con PHMeEDOT debido a que la presencia del agente nucleante y el CP hidrofílico permiten una mejor lectura de la respuesta eléctrica durante la oxidación de la vitamina K3. Por otro lado, se corrobora que el pico de oxidación de la vitamina K3 obtenido por voltametría cíclica es de 0,3 V, ya que en los gráficos de DPV se observa este potencial en el mismo punto máximo de las curvas.

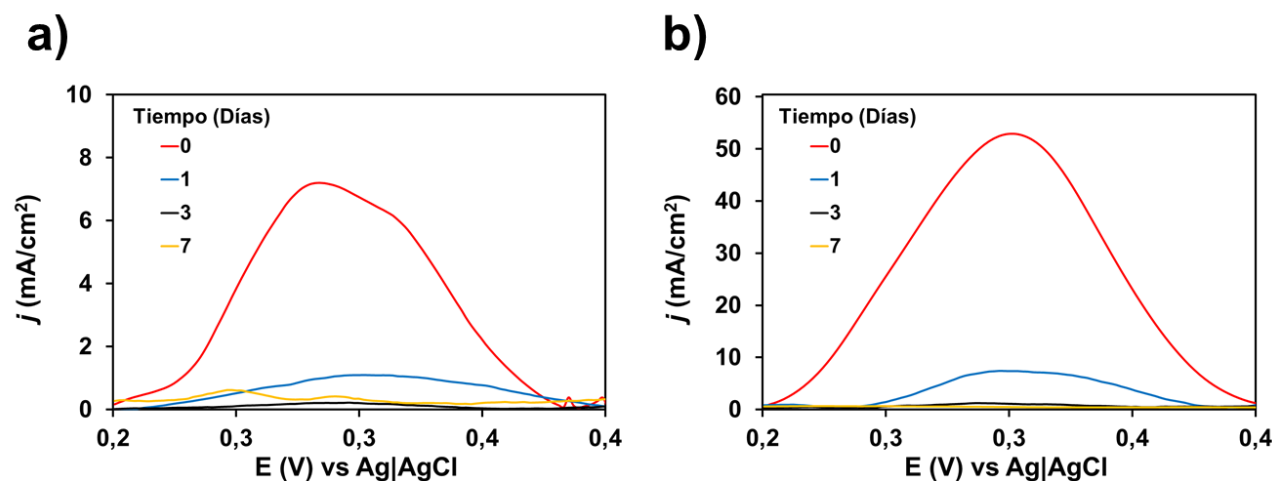


Figura 35. DPV de los hidrogeles γ-PGA/K3 (a) y DPV del [γ-PGA-PEDOT/K3] PHMeEDOT (b), lecturas obtenidas a los 0, 1, 3 y 7 días sumergidos en PBS.

Como se puede observar, a medida que aumenta el tiempo de los filmes sumergidos en PBS, aumenta también la capacidad de liberación de vitamina K3.

Para que se pueda emplear en un futuro este tipo de sensores en biomedicina, todos los componentes deben ser biocompatibles. En el presente estudio, solamente se ha determinado la capacidad del hidrogel electroconductor de liberar la vitamina K3 en un medio acuoso, pero no se ha realizado ningún estudio de la biocompatibilidad de los mismos “in vitro” o “in vivo”. Es un estudio que quedaría para trabajos futuros.

## 5. Análisis del impacto ambiental

En esta sección se describe el estudio del posible impacto ambiental causado por el trabajo llevado a cabo. El impacto ambiental se define como cualquier acción (actividades, productos o Servicios) de una organización que transforma o cambia directa o indirectamente el medio ambiente, sea dañino o no. Y el término medio ambiente como la gente, ecosistemas, propiedades, cultura, estructura socioeconómica... que son afectados durante el transcurso del proyecto.

Este proyecto es una etapa preliminar de investigación de laboratorio, por lo tanto, se considera apropiado incluir una sección que estudie el impacto medioambiental durante la fase experimental posiblemente generado por los hidrogeles.

### 5.1. Impacto medioambiental de la fase experimental

Para identificar los impactos producidos durante la investigación, es necesario entender que la causa del impacto medioambiental es la actividad y la consecuencia es el impacto. Este concepto se explica de mejor forma en la Figura 36.



*Figura 36. Esquema para identificar los impactos medioambientales*

Los principales impactos generados durante la fase experimental se analizan en la Figura 37. Para prevenir los efectos ha sido necesario: usar la normativa de seguridad de laboratorio (usar bata de laboratorio, guantes y gafas protectoras), guardar los productos y reactivos en atmosferas controladas con una ventilación apropiada y tener en cuenta las recomendaciones del proveedor. Finalmente, gestionar adecuadamente los residuos producidos, la compañía al cargo de ellos es EcoCat, las directrices seguidas para la clasificación y separación de los desechos está disponible online. (Universitat Politècnica de Catalunya 2006).

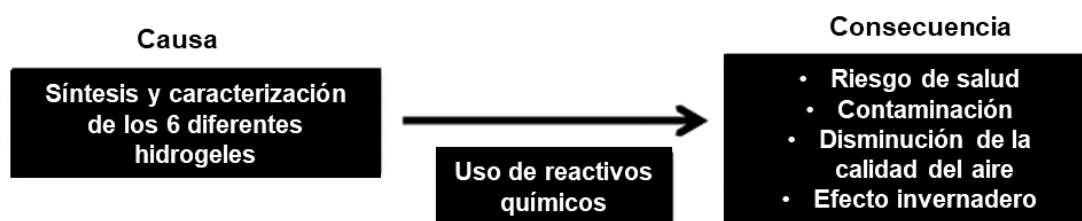


Figura 37. Causas y consecuencias provocadas durante la investigación

## 5.2. Impacto medioambiental de los hidrogeles

Este proyecto está basado en un estudio de investigación que no es aplicable a escala industrial. Por lo tanto, no es posible evaluar el impacto medioambiental de su posible aplicación. Por otra parte, es factible pensar que los compuestos generados no tendrán un impacto social y medioambiental negativo, porque puede contribuir como una plataforma bioactiva para dispositivos médicos ya que el PGA es un polímero biodegradable y los demás componentes son biocompatibles.

Por otro lado, cabe destacar que se ha trabajado con cantidades de I+D (laboratorio), hecho que hace con que el impacto en el medio ambiente esté limitado a cantidades muy bajas de material, si estos compuestos fuesen acumulativos en el medio ambiente.

### Impacto ambiental de las emisiones de CO<sub>2</sub> y consumo energético

Finalmente, en el impacto ambiental hay que tener en cuenta la generación de emisiones de dióxido de carbono, debido al consumo de energía eléctrica de la estufa calefactora (potencia de 1,4 kW), la agitación magnetotérmica (potencia de 0,82 kW) y la campana extractora (potencia de 0,25 kW). Si se considera el uso de la estufa calefactora para el secado del material de unas 20 h, el uso de la agitación magnetotérmica de unas 120 h y el uso de la campana extractora de 150 h, el consumo obtenido es el siguiente:

- Consumo de la estufa calefactora:  $1,4 \text{ kW} \cdot 20 \text{ h} = 28 \text{ kW} \cdot \text{h}$
- Consumo de la placa de agitación magnetotérmica:  $0,82 \text{ kW} \cdot 120 \text{ h} = 98,4 \text{ kW} \cdot \text{h}$
- Consumo de la campana extractora:  $0,25 \text{ kW} \cdot 150 \text{ h} = 37,5 \text{ kW} \cdot \text{h}$

El consumo total de energía eléctrica es de 163,9 kW·h.

Para calcular las emisiones de dióxido de carbono producidas es necesario consultar el boletín de 2017 del observatorio de la electricidad donde se establece que el promedio anual del año 2016 es de 0,174 Kg de dióxido de carbono por kW·h consumido. Los valores de los óxidos de nitrógeno y el dióxido de

azufre son respectivamente de 0,261 kg NO<sub>x</sub>/kW·h y 0,366 kg SO<sub>2</sub>/kW·h. Por tanto, a partir de estos valores se puede calcular la cantidad de emisiones de dióxido de carbono que se han producido a la atmosfera:

- Estufa calefactora:  $28 \text{ kW} \cdot \text{h} \cdot 0,174 \text{ kg CO}_2/\text{Kw} \cdot \text{h} = 4,87 \text{ kg CO}_2$
- Placa de agitación magnetotérmica:  $98,4 \text{ kW} \cdot \text{h} \cdot 0,174 \text{ kg CO}_2/\text{Kw} \cdot \text{h} = 17,12 \text{ kg CO}_2$
- Campana extractora:  $37,5 \text{ kW} \cdot \text{h} \cdot 0,174 \text{ kg CO}_2/\text{Kw} \cdot \text{h} = 6,53 \text{ kg CO}_2$

Por lo tanto, el impacto total medio en kilogramos de dióxido de carbono es de 28,52 kg CO<sub>2</sub>.



## Conclusiones

En este trabajo varias plataformas flexibles y electroactivas han sido sintetizadas mediante la modificación del hidrogel de  $\gamma$ -PGA con la incorporación de nanopartículas de PEDOT, las cuales fueron utilizadas como puntos de nucleación para la polimerización anódica de PHMeDOT.

El hidrogel  $\gamma$ -PGA proporcionó una matriz con una estructura interna porosa, que es crucial para permitir el proceso de difusión de diferentes sustancias, como es el caso de la vitamina K3. Al mismo tiempo, las partículas PEDOT desempeñaron un papel clave en la electropolimerización del monómero HMeDOT, favoreciendo la distribución homogénea de las cadenas de PHMeDOT a través del hidrogel, mejorando la electroactividad del material híbrido.

El compuesto [ $\gamma$ -PGA-PEDOT/K3] PHMeDOT presenta un gran potencial como sensor electroquímico para detectar la presencia de vitamina K3 y medir su liberación en un medio acuoso. Estos resultados hacen de este material una posible plataforma para la detección electroquímica de células eucariotas, que será objeto un de estudio posterior en el grupo IMEM.

.



## Presupuesto y/o análisis económico

En este capítulo se presenta una evaluación económica del proyecto, para calcular el coste global los gastos se han clasificado por reactivos y productos, equipo utilizado y personal.

### 5.3. Reactivos y productos

El coste de cada sustancia y productos usados durante las fases de síntesis y caracterización se observan en Tabla 5 y Tabla 6. Para obtener el coste final de cada reactivo ha sido necesario aplicar un factor que corresponde a la fracción de la unidad utilizada. En el caso de los productos, ha sido necesario indicar las unidades usadas. («Sigma Aldrich» 2015)

Tabla 5. Coste final de cada reactivo

Producto	Unidad	Coste por unidad (€)	Factor de uso	Coste final (€)
DBSA	250 mL	44,5	0,010	0,45
EDOT	10 g	67,2	0,370	24,86
APS	100 g	22,5	0,150	3,38
PGA	15 g	47,4	0,067	3,18
PBS	1kg	75,6	0,020	1,51
NaHCO <sub>3</sub>	500 g	18,9	0,004	0,08
Cistamina	100 g	95,8	0,023	2,20
EDC	5 g	77,8	0,594	46,18
Menadiona	25 g	47,5	0,034	1,63
PBS	1000 g	75,6	0,030	2,27
LiClO <sub>4</sub>	10 g	56,5	0,053	2,98
HMeEDOT	500 mg	133,0	0,172	22,88
KBr	250 g	48,5	0,040	1,94
Etanol	1 L	20	0,5	10,00
Acetona	1 L	42	0,5	21,00
<b>TOTAL (€)</b>				<b>144,53928</b>

Tabla 6. Coste final de cada producto

Producto	Lote	Coste por lote (€)	Unidades usadas	Coste final (€)
Acero AISI 316 L	625 mm <sup>2</sup>	90,0	100 mm <sup>2</sup>	14,4
ITO	10	349,0	1	34,9
Electrodo Ag AgCl	1	136,1	1	136,1
Papel de pesar	500	35,9	2	0,1
Tubos eppendorf	1000	36,3	100	3,6
Puntas de pipeta de 200 µL	960	68,8	50	3,6
Puntas de pipeta de 1000 µL	960	68,8	200	14,3
<b>TOTAL (€)</b>				<b>207,1</b>

## 5.4. Equipo

Los costes por hora del equipo necesario para llevar a cabo las electropolimerizaciones y las diferentes caracterizaciones se muestran en Tabla 7. Algunas caracterizaciones se hicieron en el CRnE con el ratio interno de la UPC.(Centre de Recerca en Nanoenginyeria 2006)

Tabla 7. Coste final de cada equipo

Equipo	Tiempo (h)	Coste (€/h)	Coste final (€)
Potenciostato- galvanostato	25	30,0	750,0
Espectometro FT-IR	3	5,1	15,3
Microscopio electrónico de barrido	6	106,7	640,2
Espectometro UV-Vis	18	4,9	88,2
Microscopio digital Dino-Lite	1	5,0	5,0
DLS	1	60,0	60,0
<b>TOTAL (€)</b>			<b>1558,7</b>

## 5.5. Personal

El coste laboral ha sido establecido por las horas destinadas al proyecto y considerando el salario mínimo de 8 €/h, marcado por los acuerdos de prácticas de la UPC. La Tabla 8 muestra el tiempo invertido en el proyecto y su coste asociado.

Tabla 8. Coste de personal

Actividad	Tiempo (h)	Coste (€/h)	Coste final (€)
Recerca bibliográfica	70	8,0	560,0
Trabajo experimental	410	8,0	328,00
Análisis de resultados	130	8,0	1040,0
<b>TOTAL (�)</b>			<b>4880,0</b>

En los otros gastos se incluyen la electricidad, agua y material de oficina. Para calcular esto se estima que es un 10% de los gastos calculados anteriormente, siendo 679  . Por lo tanto, el coste global del proyecto aproximado es de 7500  , la suma total se muestra en Tabla 9.

Tabla 9. Coste total

Gastos	Coste final (�)
Reactivos	144,5
Productos	207,1
Equipo	1558,7
Personal	4880,0
Otros	679,0
<b>TOTAL (�)</b>	<b>7469,4</b>



## Bibliografia

- ARMELIN, E. y MOLINA, B.G., 2016. *TFM Graft copolymers with a random distribution of pyrrole monomer with hydrophilic functionalities*. S.l.: s.n.
- BARONIAN, K., DOWNARD, A., LOWEN, R. y PASCO, N., 2003. Detection of two distinct substrate-dependent catabolic responses in yeast cells using a mediated electrochemical method. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 60, no. 1-2, pp. 108-113.
- CENTRE DE RECECA EN NANOENGINYERIA, C., 2006. CRNE Infraestructura. [en línea]. [Consulta: 10 mayo 2018]. Disponible en: <https://multiscale.upc.edu/ca/infraestructura/serveis-i-tarifes>.
- CHAKRABORTY, D.S., 2016. Instrumentation of ftir and its herbal applications. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 5, no. 3, pp. 498-505.
- DEMCHUK, O.M., JUSTYNIK, I., MIROSLAW, B. y JASINSKI, R., 2014. 2-Methoxynaphthyl-naphthoquinone and its solvate: Synthesis and structure-properties relationship. *Journal of Physical Organic Chemistry*, vol. 27, no. 1, pp. 66-73.
- FABREGAT, G. y ALEMÁN, C., 2014. PhD Tesis Conducting Polymers and Hybrid Derivatives With Specific Applications As Sensors. *Univ. Politècnica de Catalunya*. S.l.:
- FABREGAT, G., CASANOVAS, J., REDONDO, E., ARMELIN, E. y ALEMÁN, C., 2014. A rational design for the selective detection of dopamine using conducting polymers. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, vol. 16, no. 17, pp. 7850-61.
- FABREGAT, G., CORDOVA-MATEO, E., ARMELIN, E., BERTRAN, O. y ALEMÁN, C., 2011. Ultrathin Films of Polypyrrole Derivatives for Dopamine Detection. *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 115, pp. 14933-14941.
- GUIMARD, N.K., GOMEZ, N. y SCHMIDT, C.E., 2007. Conducting polymers in biomedical engineering. *Progress in Polymer Science*, vol. 32, no. 8-9, pp. 876-921.
- HAN, M.G. y FOULGER, S.H., 2004. Crystalline colloidal arrays composed of poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-coated polystyrene particles with a stop band in the visible regime. *Advanced Materials*, vol. 16, no. 3, pp. 231-234.
- HERRERA, A., CURCÓ, D. y ARMELIN, E., 2014. TFG Synthesis of conducting polymers. [en línea], Disponible en: <http://www.santjoandedeu.edu.es/files/TFGwebmaig2013.pdf>.
- KARAGKIOZAKI, V. y LOGOTHETIDIS, S., 2014. *Horizons in clinical nanomedicine*. S.l.: Pan Stanford.
- MAC, M. y WIRZ, J., 2002. Salt effects on the reactions of radical ion pairs formed by electron transfer quenching of triplet 2-methyl-1,4-naphthoquinone by amines. Optical flash photolysis and step-scan FTIR investigations. *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 1, no. 1, pp. 24-29.
- MATSUSAKI, M., YOSHIDA, H. y AKASHI, M., 2007. The construction of 3D-engineered tissues

- composed of cells and extracellular matrices by hydrogel template approach. *Biomaterials*, vol. 28, no. 17, pp. 2729-2737.
- PÉREZ-MADRIGAL, M.M., EDO, M.G., DÍAZ, A., PUIGGALÍ, J. y ALEMÁN, C., 2017. Poly- $\gamma$ -glutamic Acid Hydrogels as Electrolyte for Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-Based Supercapacitors. *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 121, no. 6, pp. 3182-3193.
- PUIGGALÍ-JOU, A., MICHELETTI, P., ESTRANY, F., DEL VALLE, L.J. y ALEMÁN, C., 2017. Electrostimulated Release of Neutral Drugs from Polythiophene Nanoparticles: Smart Regulation of Drug-Polymer Interactions. *Advanced Healthcare Materials*, vol. 6, no. 18, pp. 1-11.
- RAWSON, F.J., DOWNARD, A.J. y BARONIAN, K.H., 2014. Electrochemical detection of intracellular and cell membrane redox systems in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, vol. 4, pp. 1-9.
- RODRÍGUEZ, A. y ARMELIN, E., 2015. TFG Síntesis de nanopartículas de polímero conductor para la aplicación en recubrimientos para la protección del aluminio. , pp. 1-77.
- SABORIO, M., ESTRANY, F. y ALEMÁN, C., 2018. *PhD Thesis Developmet of flexible electrodes and lightweight capacitors Maricruz Saborío González*. S.l.: Universitat Politècnica de Catalunya.
- SABORÍO, M.C.G., LANZALACO, S., FABREGAT, G., PUIGGALÍ, J., ESTRANY, F. y ALEMÁN, C., 2018. Flexible Electrodes for Supercapacitors Based on the Supramolecular Assembly of Biohydrogel and Conducting Polymer. *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 122, no. 2, pp. 1078-1090.
- SHI, F., XU, Z. y CEN, P., 2007. Microbial production of natural poly amino acid. *Science in China Series B: Chemistry*, vol. 50, no. 3, pp. 291-303.
- Sigma Aldrich. [en línea], 2015. [Consulta: 12 mayo 2018]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/AdvancedSearchPage.do>.
- UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA, U., 2006. Prevención de Riesgos Laborales. [en línea]. [Consulta: 10 mayo 2018]. Disponible en: <https://www.upc.edu/prevencio/es/seguridad-e-higiene/recogida-de-residuos>.
- WANG, Y., WANG, H., XU, J., HE, B., LI, W., WANG, Q., YANG, S. y ZOU, B., 2017. PEDOT:PSS Modification by Blending Graphene Oxide to improve the Efficiency of Organic Solar Cells. *Polymers and Polymer Composites*, vol. 16, no. 2, pp. 101-113.